

Contribution à l'étude du mécanisme du phénomène de Boas

THÈSE

présentée et soutenue publiquement le Mars 1933

à la Faculté de Pharmacie de Nancy

POUR OBTENIR LE TITRE DE

Docteur de l'Université
(Mention Pharmacie)

PAR

Lucienne GEORGES

Pharmacien

Diplômée de Microbiologie

Ex-préparateur à la Faculté de Pharmacie

Lauréat de la Faculté et de l'Université

Née le 4 Septembre 1908 à Lunéville (M.-et-M.)

Examineurs de la Thèse :	{	MM. LASSEUR.....	Président.
		VERNIER.....	Juges.
		CORDEBARD.....	

NANCY

SOCIÉTÉ D'IMPRESSIONS TYPOGRAPHIQUES

1933

PERSONNEL ENSEIGNANT

DOYEN HONORAIRE:

M. BRUNTZ, O. ✱, ☞, I ☞, O. ☞, ✱, ✱, Recteur de l'Académie de Nancy

PROFESSEURS HONORAIRES:

MM. FAVREL, ✱, I ☞

BRUNTZ, O. ✱, ☞, I ☞, O. ☞, ✱, ✱

DOYEN:

M. SEYOT, ✱, ☞, I ☞, ☞

ASSESSEUR:

M. LASSEUR, I ☞, ☞

PROFESSEURS:

MM. GRÉLOT, ✱, I ☞, ☞	Pharmacie galénique.
DOURIS, I ☞, ☞, ✱	Toxicologie.
PASTUREAU, O ✱, I ☞	Pharmacie chimique.
SEYOT, ✱, ☞, I ☞, ☞	Histoire naturelle.
LASSEUR, I ☞, ☞	Microbiologie.
GILLOT, I ☞, ☞	Matière médicale.
PREVOST ☞, chargé de cours magistral	Chimie organique.

AGRÉGÉ LIBRE:

M. GIRARDET, ✱, I. ☞..... Chimie et Toxicologie.

CHARGÉS DE COURS

MM. GRÉLOT, ✱, I ☞, ☞	Hydrologie.
PASTUREAU O ✱, I ☞	Chimie biologique.
SEYOT ✱, ☞, I ☞, ☞	Hygiène.
VERNIER, I ☞	Zoologie,
GILLOT, I ☞, ☞	Pharmacotechnie.
CORDEBARD, I ☞, ☞	Analyse chimique.
RENARD, I ☞	Législation et Déontologie.
PREVOST ☞	Chimie minérale et Minéralogie
DONZELOT.	Physique.

CHEFS DE TRAVAUX:

MM. VERNIER, I ☞	Microbiologie et Parasitologie.
CORDEBARD, I ☞, ☞	Chimie et Analyse chimique.
STEIMETZ	Micrographie.
MEUNIER	Pharmacie.
DONZELOT, (chargé de travaux).	Physique.
MICHON (chargé de travaux)..	Chimie biologique et Toxicologie.

SECRÉTARIAT:

M. E. TRIBOLET, I ☞..... Secrétaire.

La Faculté a arrêté que les opinions émises dans les dissertations qui lui sont présentées doivent être considérées comme propres à leurs auteurs, et qu'elle n'entend ni les approuver ni les imputer.



A MES PARENTS

Témoignage de mon affection.



A. M. le Professeur LASSEUR

Témoignage de respectueuse reconnaissance.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

TABLE DES MATIÈRES

	PAGES
INTRODUCTION.....	9
CHAPITRE I	
<i>Généralités sur le problème de la perméabilité de la membrane des cellules et des plastides.....</i>	13
Théories relatives au problème de la perméabilité.....	17
Facteurs régissant la perméabilité de la membrane.....	25
CHAPITRE II	
<i>Variation de volume des corps microbiens, variation de fixation d'un colorant en fonction du sulfocyanure de potassium et des ions H+</i>	
Généralités	35
Les faits décrits par BOAS sont exacts.	
Technique	36
Résultats expérimentaux.....	38
Etude du mécanisme du phénomène de BOAS.	
Recherches personnelles. — Technique.....	41
Résultats expérimentaux :	
Essais effectués avec <i>B. caryocyanus</i>	46
Essais effectués avec <i>Endomyces albicans</i>	50
Interprétation des faits.....	53
CHAPITRE III	
<i>Influence de la composition de la solution tampon.</i>	
Généralités.....	55
Recherches personnelles. — Technique.....	56
Résultats expérimentaux.....	58
Conclusions	61
CHAPITRE IV	
<i>Influence de la concentration en ions OH— sur l'opacité de quelques suspensions microbiennes.</i>	
Généralités	63
Recherches personnelles. — Technique.....	65
Résultats expérimentaux.....	67
Interprétation des faits.....	68

CHAPITRE V

*Influence des électrolytes sur les variations de volume des corps microbiens
et sur les variations de fixation d'un colorant
par les mêmes éléments en fonction du sulfocyanure de potassium.*

Généralités	71
Recherches personnelles. — Technique.....	71
Résultats expérimentaux.....	77
Interprétation des faits.....	80

CHAPITRE VI

Influence de la tension superficielle sur la vie de quelques Bactéries.

Généralités et historique.....	82
Recherches personnelles.....	90

CHAPITRE VII

*Relation entre la tension superficielle et le volume des corps microbiens,
entre la tension superficielle et la fixation d'un colorant par les
mêmes éléments en fonction des ions H^+ et du sulfocyanure de
potassium*

Recherches personnelles. — Technique.....	95
Résultats expérimentaux.....	96

CONCLUSIONS GÉNÉRALES.....	103
----------------------------	-----

BIBLIOGRAPHIE	109
---------------------	-----

INTRODUCTION

Ce mémoire apporte une modeste contribution à l'étude du mécanisme du phénomène de BOAS. Si je me suis limitée à un petit nombre de faits, j'en indiquerai les raisons. Tout d'abord je voudrais expliquer comment j'ai été conduite à étudier l'action des ions sur les phénomènes vitaux.

Lorsqu'on réfléchit à l'origine de nos idées, on constate que « *la raison n'entre que pour une bien faible part dans leur formation* » et que nous acceptons volontiers les idées exprimées par nos maîtres. LASSEUR pense (et en cela il est d'accord avec l'Ecole américaine si brillamment représentée par BERGEY, Martin FISCHER, etc...) qu'il faut adapter l'exposé d'une discipline à la culture des auditeurs, c'est la raison pour laquelle l'enseignement de la Microbiologie à la Faculté de Pharmacie de Nancy n'est pas un reflet de celui qui est donné dans les Facultés de Médecine. L'enseignement que j'ai suivi, s'appuie surtout sur la culture botanique, zoologique, chimique et physique, il fait beaucoup plus appel aux généralisations qu'aux applications, ce qui n'est pas surprenant, car la Microbiologie a étendu ses ramifications dans tant de directions qu'un mathématicien, physicien, physico-chimiste, chimiste, pharmacien trouve dans les microbes un matériel éminemment favorable à l'étude statistique des phénomènes (LASSEUR et DUPAIX).

Tout microbiologiste n'est pas également apte à manier toute méthode, l'essentiel est qu'il suive sa vocation, ce point est capital. Ayant toujours eu une prédilection pour les Sciences physico-chimiques, je devais plus particulièrement être intéressée par le phénomène de BOAS.

Je vais rappeler brièvement l'ensemble des processus signalés par BOAS.

Dans une culture mixte *Bactéries* + *Champignons*, il est possible de faire dominer l'un ou l'autre des éléments microbiens par addition d'ions convenables au milieu nutritif. Cette action sélective des ions ou « *phénomène phylétique* », bien connue depuis les belles recherches de BOAS, ouvre des horizons nouveaux sur la nutrition des microorganismes. De plus, elle est susceptible d'applications à l'industrie et à l'hygiène.

Notre attention fut attirée sur les recherches de BOAS par les premières publications de KÆNIG. Nous soulignons d'autant plus volontiers ce fait que nous sommes très heureux de pouvoir manifester notre reconnaissance au savant français, qui a consacré sa vie à la recherche désintéressée.

L'intérêt du phénomène de BOAS ne pouvait pas être méconnu dans un Laboratoire qui oriente la plus grande partie de son activité vers la Microbiologie générale. Aussi, dans les Fascicules IV et V des Travaux du Laboratoire de Microbiologie de la Faculté de Pharmacie de Nancy, le Lecteur trouvera-t-il le résumé des recherches effectuées dans cette voie par Ph. LASSEUR et ses élèves.

En collaboration avec M. le Professeur LASSEUR et A. DUPAIX, j'ai étudié l'action de l'ion SCN— sur les Bactéries et les Champignons. A ce propos je rappellerai l'explication des faits proposée par BOAS. Toute cellule vivante (1) possède un système protecteur (« *complexe albumineux spécifique* », lipides, phosphatides) la défendant contre l'adsorption exagérée et réglant la pénétration des substances dans la cellule. L'ion SCN— est doué d'une « *puissante action de surface* » et lorsqu'il arrive au contact de l'élément microbien il est fortement adsorbé. L'adsorption a comme conséquence immédiate la destruction des lipides protecteurs et, de ce fait, l'ion SCN— « *favorise intensivement sa propre pénétration et celle d'autres substances dans le plasma* ». Puis secondairement, il détermine un gonflement de l'élément anatomique; enfin, il dissocie éventuellement le complexe albumineux. A partir de ce stade, l'ion SCN— s'oppose à l'adsorption.

J'expose les faits d'après mes propres impressions mais je n'affirme pas que BOAS interprète ainsi le phénomène, car le savant allemand est original jusqu'à la profusion, jusqu'à l'excès. Ce n'est pas une grande rareté que l'outrance qui se voit dans certaines façons de considérer les choses. Ce qui est rare, c'est de rencontrer une vision très particulière alliée à une habileté extraordinaire à mettre en œuvre tout l'appareil classique pour soutenir sa théorie. Les ressources de BOAS, en ce qui concerne l'érudition, sont remarquables, mais la complexité des faits rend l'explication du phénomène extrêmement délicate, et on ne peut pas toujours affirmer avoir saisi la pensée de l'auteur.

Cette complexité des faits décrits par BOAS n'est pas une exception. Les faits biologiques en faisant intervenir un nombre élevé de variables ne peuvent guère être ramenés à un schéma simplifié. Dans les recherches que j'ai effectuées j'ai obtenu tantôt des résultats concordants (à la précision des mesures ou à l'échelle d'observation utilisées) tantôt des résultats discordants sans que je puisse pour cela parler de causes d'erreur précises. Je me suis donc vue obligée de multiplier les expériences et d'avoir recours à la moyenne arithmétique. LE CHATELIER à qui l'on doit une vision intense de la recherche scientifique, s'est élevé contre l'emploi des moyennes

(1) Cellule des Champignons, plastide des Bactéries.

arithmétiques. L'illustre savant français montre que l'usage des moyennes est tout à fait général, mais qu'on présente le calcul de la moyenne arithmétique sous trois formes différentes qui sont au fond identiques :

- la moyenne arithmétique proprement dite ;
- la moyenne des différences nulles ;
- la règle des moindres carrés.

« *Malgré son usage presque universel, cet emploi de la moyenne arithmétique est tout à fait irrationnel.* » Aussi pour combiner plusieurs expériences LE CHATELIER propose-t-il l'emploi du nombre probable. Pour LE CHATELIER « *le nombre probable est le nombre obtenu dans l'expérience moyenne, qui sépare l'ensemble des mesures faites en deux groupes de même importance comprenant l'un des résultats supérieurs et l'autre des résultats inférieurs à ce nombre. On le détermine pratiquement en prenant la liste des mesures dans l'ordre où elles ont été faites, et en rayant alternativement le chiffre le plus élevé et le plus faible, jusqu'à ce qu'il n'en reste plus qu'un dans le cas des expériences en nombre impair, ou deux dans le cas des expériences en nombre pair; on prend alors la moyenne de ces deux derniers* » (LE CHATELIER, *Science et Industrie*, p. 89).

Dans les résultats que je résumerai au cours de cet exposé, j'ai employé concurremment la moyenne arithmétique et le nombre probable de LE CHATELIER.

J'ai divisé ce travail en sept chapitres. Tout d'abord, j'ai résumé un certain nombre de faits relatifs à la perméabilité de la membrane (théories proposées pour expliquer la perméabilité des cellules et des plastides, facteurs régissant la pénétration des substances dans l'élément anatomique).

Puis, j'ai envisagé l'action du sulfocyanure de potassium: 1° sur les variations de volume d'une Bactérie (*B. caryocyanus* BEIJERINCK-DUPAIX) et d'un Champignon (*Endomyces albicans* VUILLEMIN); 2° sur les variations de fixation d'un colorant par les mêmes microorganismes. Ces deux variations ont été étudiées en fonction des facteurs suivants :

- a) concentration en ions H^+ ;
- b) composition des solutions tampons avec lesquelles sont réalisées les suspensions ;
- c) addition d'une solution d'électrolytes.

Le chapitre V est consacré à l'étude des modifications d'opacité des suspensions microbiennes sous l'influence des ions OH^- .

Enfin, j'ai cherché si la tension superficielle jouait un rôle important dans la vie des Bactéries (forme, végétation, chromogénèse) et si ce facteur pouvait me permettre une interprétation du phénomène de BOAS.

Avant de commencer l'exposé de mes recherches poursuivies au Laboratoire de Microbiologie de la Faculté de Pharmacie de Nancy, je me permets de manifester mes sentiments de reconnaissance à M. le Recteur BRUNTZ pour les marques de haute bienveillance qu'il n'a cessées de me témoigner au cours de mes études.

Je remercie M. le Doyen SEYOT de l'intérêt qu'il a bien voulu me porter pendant mon séjour à la Faculté de Pharmacie.

Je prie M. le Professeur VERNIER d'agréer l'expression de ma vive reconnaissance pour les conseils qu'il m'a prodigués et pour le temps qu'il a consacré à la lecture de mes modestes recherches.

M. le Professeur CORDEBARD a bien voulu m'accueillir dans son Laboratoire et accepter de lire et juger ce travail ; je l'en remercie profondément.

J'exprime à M. le Professeur GILLOT toute ma reconnaissance pour la bienveillance qu'il m'a toujours manifestée.

Grâce à l'amabilité de M. le Professeur RAUX, Directeur de l'Ecole de Brasserie, j'ai pu entreprendre mes recherches sur les Champignons. Je l'en remercie respectueusement.

M. le Professeur LASSEUR a dirigé toutes mes expériences, s'est arraché de nombreux instants à ses multiples travaux pour vérifier la marche et les résultats de mon expérimentation, m'a mise en garde contre les écueils que rencontre le débutant et m'a aidée à interpréter les résultats obtenus au cours de ces deux années de recherches. Je prie M. le Professeur LASSEUR d'agréer l'expression de ma profonde gratitude.

Je remercie très sincèrement mon excellente camarade Andrée DUPAIX, avec laquelle j'ai effectué toutes mes expériences, de la sympathie dont elle n'a cessé de m'entourer et de son aimable obligeance.

Mes camarades Mlle RENAUX et M. GROJEAN m'ont singulièrement facilité la tâche, je les en remercie également.

Je n'oublie pas MM. JACQUOT et SACCHETTI dont j'ai mis souvent à l'épreuve l'inépuisable complaisance.

CHAPITRE I

Généralités sur le problème de la perméabilité de la membrane des cellules et des plastides

L'étude du mécanisme du phénomène de BOAS est dominée par la question de perméabilité de la membrane. C'est pourquoi avant d'aborder l'exposé de mes recherches, je désire résumer un certain nombre de faits relatifs à ce sujet (1). Certes, après les synthèses magistrales de E. GELLHORN (1929), P. GIRARD (1929), R. HÖBER (1930), je n'ai pas la prétention d'esquisser une vue d'ensemble sur le problème de la perméabilité. Je veux seulement préciser, autant qu'il m'est possible, l'idée qui a présidé à la réalisation de mes expériences et, enfin, éviter des répétitions bibliographiques fastidieuses.

J'envisagerai donc successivement les théories proposées pour expliquer la perméabilité des cellules et des plastides, puis, abandonnant la généralisation, je poursuivrai l'étude de quelques paramètres régissant la pénétration des substances dans l'élément anatomique.

L'étude de la perméabilité de la membrane des Bactéries implique la croyance en une membrane.

En ce qui concerne les cellules des Végétaux l'existence de la membrane n'a jamais été mise en doute. Pour les Bactéries, cette existence, longtemps considérée comme un dogme par les microbiologistes, a été quelque peu contestée par les savants qui, implicitement ou non, ont adopté la conception de l'ectoplasme de BUTSCHLI-ZETTNOW (1890-1891).

(1) Pour la rédaction de ce Chapitre, je fais de larges emprunts au Fascicule V des travaux du Laboratoire de Microbiologie de la Faculté de Pharmacie de Nancy et à un mémoire inédit de M. LASSEUR [Fascicule VI des Travaux du Laboratoire (en préparation)].

S'inspirant des travaux de BUTSCHLI (1890), ZETTNOW (1891) a entrepris une série de recherches destinées à mettre en évidence une couche externe différenciée chez les Bactéries. (*Spirillum serpens*, *Spirillum undulans*, *B. proteus*) par la méthode de LOEFFLER. Il constate la présence d'un corps central, très coloré et l'existence de parties difficilement colorables situées aux extrémités ou sur les parois latérales de l'élément microbien. ZETTNOW se range à l'avis de KLEBS (1884) et de BUTSCHLI (1890) et considère la partie centrale comme le noyau de la Bactérie, le reste de la plastide constituant le plasma.

En 1897, ZETTNOW colore des Spirilles à l'aide du Bleu de méthylène à une concentration telle que les Bactéries ne soient pas tuées. Dans ces conditions d'expérience, l'auteur arrive aux mêmes conclusions que précédemment, mais il ajoute que toutes ses recherches « *ont été vaines pour mettre en évidence une membrane chez les Spirilles et B. granulosis* ». « *Les Spirilles peuvent être enveloppés par une couche qui ne se laisse colorer que par les méthodes de coloration des fouets... Avec les fouets cette couche correspond au plasma, à la « couche corticale de BUTSCHLI.* » ».

Poursuivant ses recherches, ZETTNOW (1899) utilise la méthode de coloration de ROMANOSWKI. La plus grande partie de l'élément bactérien se colore en rouge : c'est le noyau. Les régions colorées en bleu correspondent à l'« *entoplasma* ». Quant à la partie du protoplasme qui se teint après mordantage mais reste incolore dans la méthode de ROMANOSWKI, ZETTNOW propose de la désigner sous le nom d'« *ektoplasma* ». L'auteur reconnaît que, chez certains germes, il est impossible de mettre l'« *entoplasma* » en évidence et même ce dernier peut faire défaut ou être intimement mélangé à la chromatine.

FEINBERG (1900) et BUTSCHLI (1902) se rangent à l'avis de ZETTNOW. Mais, à la suite des travaux de P. EISENBERG (1909) la question se complique. Allant de l'extérieur à l'intérieur d'une plastide, on trouverait successivement : la membrane, l'ectoplasme et l'endoplasme.

Malheureusement, NEIDE (1904), et GRIMME (1902) qui ont étudié systématiquement la coloration de GRAM n'ont jamais observé l'ectoplasme. Il n'en est pas de même pour BREINL (1924) et GUTSTEIN (1924), ces auteurs admettent que la colorabilité des germes dans la méthode de GRAM est sous la dépendance de l'ectoplasme.

GOTSCHLICH (1912) pense que la théorie de ZETTNOW donne l'interprétation la plus satisfaisante de tous les faits connus. Et, en 1929, GOTSCHLICH conserve la division en « *ektoplasma* » et en « *entoplasma* », tout en reconnaissant l'existence possible de la « *membrane cellulaire* ».

R. LEGROUX et J. MAGROU (1920) consacrent un mémoire important à l'étude de l'« état organisé des colonies bactériennes ». Pour ces savants « l'ectoplasme bactérien... est l'origine de la substance interstitielle donnant aux colonies plissées leur cohésion et leur structure compliquée organoïde ».

Mais, en 1918, ZETTNOW modifie profondément sa façon de voir et, après de nouveaux essais de coloration des Bactéries, le savant allemand conclut à l'existence de la membrane chez toutes les Bactéries et même chez les grands Spirilles. L'auteur, utilisant des mordants, déclare qu'« avec un mordant, fort, on voit nettement que l'ectoplasme, c'est-à-dire la membrane et la couche mucilagineuse, sont seuls colorés ». Cette couche mucilagineuse, c'est la capsule des bactériologistes.

Ces quelques faits étant posés, j'admettrai l'existence de la membrane chez les Bactéries ou plus exactement d'une couche périphérique modifiée analogue à celle que l'on rencontre chez les Levures. (Nous donnons à cette couche le nom de membrane tout en reconnaissant aux autres le droit de l'appeler « ectoplasme ».)

« L'échelle d'observation crée le phénomène » écrit GUYE. Cette pensée profondément juste est à la base de l'étude de la membrane en Microbiologie. En effet, l'expérimentateur qui se contente d'examiner des plastides bactériennes fortement colorées ne verra qu'une masse uniforme dans laquelle il est impossible de distinguer une partie périphérique d'une masse centrale. L'image (j'insiste sur ce mot, que je ne confonds pas avec la réalité) de la plastide change considérablement lorsqu'on s'adresse à des colorants électifs ou à des solutions colorantes aqueuses très diluées ou même simplement lorsque l'examen est effectué sur matériel vivant non coloré. Dans ce dernier cas l'examen microscopique, à un grossissement convenable (1500 diamètres) à l'aide d'objectifs apochromatiques, montre l'existence d'une couche périphérique de faible épaisseur, d'une réfringence différente de celle du reste de la plastide (*B. chlororaphis*, *B. balticus*, *B. caryocyaneus*, *B. mesentericus*). Considérons maintenant un filament bactérien formé de deux ou trois plastides, nous constatons que chaque plastide est séparée de la voisine par une cloison transversale qui vient se fondre insensiblement dans les parois latérales.

L'emploi de solutions colorantes (1) aqueuses diluées permet de percevoir

(1) Colorants convenablement choisis.

plus aisément l'image que nous venons de décrire. L'étude des bâtonnets germinatifs des Bactéries sporogènes à l'aide de la fuchsine formolée montre d'une façon évidente que la membrane n'est pas une pure vue de l'esprit, mais qu'elle correspond bien à une réalité objective. Dans de telles préparations, les filaments se présentent sous la forme de deux lignes parallèles roses, réunies par des cloisons perpendiculaires colorées aussi en rose.

Avec certaines Bactéries (*B. pasteurianum*), le traitement par une solution d'iode iodurée permet de percevoir l'image suivante : une ligne colorée en bleu entoure le reste de la plastide teint en jaune (A. MEYER, 1912). Il ne semble pas que l'on puisse attribuer à cette ligne bleue une signification autre que celle d'une membrane.

Substituons maintenant l'examen ultramicroscopique à l'examen microscopique. Nous constatons que la membrane de la plastide bactérienne des Bactéries asporogènes se réduit à une ligne bleutée ou jaunâtre suivant l'espèce considérée, très brillante, limitant un espace central sombre (1). Cette couche périphérique doit évidemment être assimilée à la ligne brillante fournie par la membrane des Levures.

L'existence de la membrane chez les Bactéries a d'ailleurs été admise par tous les spécialistes de la cytologie bactérienne : Arthur MEYER et ses élèves, GUILLIERMOND, BEAUVERIE, HOLLANDE, etc.... J'admettrai donc que la Bactérie est pourvue d'une membrane.

Les Bactéries ne font pas exception dans l'échelle des êtres organisés : « *L'être vivant, partant du plus simple jusqu'au plus élevé dans l'échelle biologique, n'est qu'un assemblage de petites masses de protoplasma (à substratum protéinique) reliées et en même temps séparées par des membranes plus ou moins compliquées. Des échanges constants entre elles résulte ce qu'on peut appeler l'activité vitale.* » (PIETTRE et CHRÉTIEN, p. 19, 1929) et W. KOPACZEWSKI écrit en 1931 : « *On est donc autorisé à supposer que chaque cellule s'entoure d'une couche physiquement, tout au moins, différente des couches sous-jacentes; cette couche limitante constitue la barrière entre les cellules identiques, mais conservant leur individualité; cette couche doit exister, ne fût-ce que grâce à la loi réglant la différenciation d'une couche homogène au contact de phases diverses.* » (p. 283, 1931).

DONNAN, à son tour, déclare que la vie ne se comprend pas sans cellule pourvue de membrane.

(1) Chez les Bactéries pourvues de substances de réserve, les grains de graisse brillent avec une vive intensité dans l'espace sombre (A. MEYER, GUILLIERMOND).

Il ne suffit pas que la cellule possède une membrane, il faut que celle-ci soit active. J. DUCLAUX fait remarquer que : « *Tout ce qui vient de l'extérieur (les aliments, au sens le plus général du mot, en y comprenant l'oxygène et l'eau) doit traverser une ou plusieurs membranes avant d'arriver au point où il doit être utilisé. Ces membranes doivent donc être perméables à certains corps* ».

« *Au contraire, tout ce qui est à l'intérieur de l'organisme doit y rester, à l'exception de quelques produits déterminés qui constituent les excréments, et dont l'élimination est absolument nécessaire. Donc, les mêmes membranes doivent être imperméables à la plupart des substances et perméables à d'autres...* » (J. DUCLAUX, p. 196, 1920).

La membrane doit par conséquent être perméable aux substances et aux produits qu'elle doit éliminer. « *Comment pouvait-on concevoir une cellule vivante, donc une cellule qui doit se nourrir et éliminer, comme perméable uniquement à l'eau; on aurait dû se demander comment les produits nécessaires à la vie de la cellule, tels que les sels, pouvaient pénétrer dans l'intérieur, et aussi comment les déchets de la vie cellulaire peuvent être évacués ?* » (KOPACZEWSKI, p. 283, 1931).

Théories relatives au problème de la perméabilité

Ces quelques faits étant posés, je vais envisager les théories relatives au problème de la perméabilité.

Les premières recherches ont été effectuées sur les membranes artificielles. La plasmolyse, découverte par PRINGSHEIM (1854), analysée par NAEGELI (1855), fut interprétée par PFEFFER à la suite des expériences de TRAUBE (1867). Ces tentatives d'interprétation s'expliquent par le fait que les recherches utilisant les membranes animales ou végétales n'avaient, depuis DUTROCHET, conduit à aucune généralisation.

VAN'T HOFF donna une étude théorique complète de l'osmose et contribua ainsi pour une large part au succès de la notion d'hémiperméabilité. Puis les recherches d'OVERTON, de VRIES (1883, 1884, 1888, 1889), HAMBURGER (1889, 1891, 1892, 1893) et F. WEBER (1927, 1929) précisèrent la notion de plasmolyse.

Si les observations avaient porté sur un temps plus long, les auteurs auraient vu la déplasmolyse succéder à la plasmolyse, par suite la notion d'hémiperméabilité aurait été modifiée.

Il y a plus, on ne pouvait pas s'attendre à transposer, sans modifications, dans le domaine des êtres vivants, les faits observés avec des

membranes artificielles. Et cependant R. HÖBER écrit en 1922 : « *Les cellules sont comparables à un osmomètre de PFEFFER dont la membrane semi-perméable serait constituée par la couche limite du protoplasme : la membrane plasmatiche.* » (R. HÖBER, p. 405, 1922).

Nous venons de signaler les différences profondes qui existent entre les membranes vivantes et les membranes artificielles. En attachant de grands soins à la préparation de ces dernières, on peut admettre la possibilité d'obtenir des membranes artificielles comparables les unes aux autres. Il n'en est plus de même lorsqu'on s'adresse à l'être vivant. Si, morphologiquement, les différentes membranes microbiennes paraissent identiques, au point de vue de leur fonctionnement physiologique, elles varient avec l'espèce, la race et même l'individu considérés. L'influence individuelle peut être en partie atténuée en substituant au mélange de populations que constituent les cultures usuelles des laboratoires la culture obtenue en partant d'un seul élément microbien. C'est ce qui a été réalisé notamment dans mes recherches sur *B. caryocyaneus*.

« *Dans ces conditions, le nombre d'éléments intervenant dans la statistique est plus grand, l'amplitude des fluctuations est plus faible, elle ne masque pas, en général, la tendance générale, c'est-à-dire la loi statistique... En opérant sur des lignées, on aura donc plus de chance, si les conditions d'existence sont bien définies, de pouvoir dégager des conclusions utiles de la statistique.* » (GUYE, CHODAT, in LASSEUR, 1932).

Le biologiste n'est pas le seul à étudier des phénomènes compliqués. L'industriel doit envisager un nombre considérable de variables. C'est ce qui rendrait toute étude impossible (1) si l'on devait tenir compte de toutes les variables. Pratiquement, l'industriel est conduit à négliger « *les variables qu'il sait avoir le moins d'influence sur le résultat final* ». (H. LE CHATELIER, p. 167). J'ai pensé que, dans une certaine mesure, je pourrais, moi aussi, négliger le facteur d'action individuelle en opérant sur des lignées.

THÉORIE DU VOLUME MOLÉCULAIRE

PFEFFER avait observé que les membranes de ferrocyanure avaient une perméabilité spéciale pour des sels de potassium (nitrate et sulfate).

Mais c'est COLLANDER (1924) qui, généralisant, a montré que les mem-

(1) LE CHATELIER montre que pour une fonction de 10 variables, on devrait faire des mesures correspondant à 10 valeurs de chaque variable par exemple, soit 10 milliards de mesures.

branes de ferrocyanure de cuivre se comportent de façon très variable vis-à-vis d'un grand nombre de non-électrolytes. La vitesse de pénétration de ces non-électrolytes dépend de leur volume moléculaire et la membrane laisse passer les substances d'autant plus facilement que les pores sont plus grands et les molécules plus petites; dans ce cas, la membrane fonctionne comme un tamis.

THÉORIE DES LIPOIDES

La théorie des lipoides a été proposée par OVERTON: le protoplasme est entouré d'une couche lipoidique L (*lécithine* + *cholestérine*). La pénétration d'une substance B dans une cellule C dépend de la solubilité de B dans la couche L.

Cette théorie, qui a connu un succès considérable, n'explique cependant pas la pénétration rapide de l'eau dans la cellule. De plus, RUHLAND a montré que des colorants très solubles dans les lipoides (Bleu de nuit, Bleu Victoria) ne traversent pas la membrane, et que des colorants insolubles dans les lipoides (Vert malachite, Brun de Bismarck, Thionine) la traversent facilement.

Pour expliquer certaines anomalies de la théorie d'OVERTON, NIRENSTEIN propose d'utiliser comme test de solubilité non plus le mélange *lécithine* + *cholestrine*, mais le mélange *huile* + *eau* + *diamylamine*, et, grâce à cet artifice, NIRENSTEIN expliquerait certaines irrégularités observées avec les colorants basiques.

Malgré les tentatives de NIRENSTEIN, les recherches de RUHLAND (1908), HÖBER (1909), GARMUS (1912) montrent que la théorie des lipoides n'est pas applicable à tous les cas et qu'il faut faire appel à d'autres facteurs d'action dans l'étude de la perméabilité.

BECHHOLD, à qui la science est redevable de si remarquables recherches biophysiques et biochimiques, a étudié le mécanisme de l'hémolyse (1927). Ce savant considère la membrane du globule rouge comme un réseau de mailles protéiques remplies d'une solution colloïdale « *Cholesterin in Lecithin* ». Or, pour expliquer l'hémolyse, l'auteur ne fait jamais appel à la liposolubilité.

THÉORIE DE HANSTEEN ET CRANNER

HANSTEEN et CRANNER (1914-1922) considèrent les couches plasmatiques et les membranes des vacuoles comme un système colloïdal dont le milieu de dispersion semi-solide est formé de phosphatides insolubles dans l'eau,

alors que la phase dispersée est représentée par des phosphatides solubles dans l'eau.

THÉORIE DE HAYNES

HAYNES fait intervenir la réaction du milieu. Le milieu de dispersion de l'émulsion colloïdale constituant la membrane est une solution tampon. Les sels agissent sur la perméabilité par déplacement du pH des solutions tampons.

THÉORIE DE L'ADSORPTION

TRAUBE (1905) appuie sa théorie de l'osmose sur la « *pression de surface* ». Si une membrane sépare deux liquides, le liquide à tension superficielle la plus forte traverse la membrane. C'est la différence de tension superficielle, la « *pression de surface* », qui détermine la vitesse et la direction de l'osmose. TRAUBE rejette la théorie lipodique et propose la théorie de l'« *Haftdruck* ». Les substances à pression de fixation très petite ont plus de chance de pénétrer dans la phase voisine (membrane) que les substances à pression de fixation plus grande. En analyse capillaire, W. ARCISZEWSKI, F. CZARNECKI, W. KOPACZEWSKI et W. SZUKIEWICZ constatent des faits analogues.

Nous retrouvons donc là le phénomène de l'adsorption. D'après l'équation de GIBBS : si la tension superficielle décroît quand la concentration de la solution augmente la concentration du corps dissous dans la couche superficielle est supérieure à sa concentration dans la solution : c'est l'adsorption positive.

Mais il faut aussi tenir compte de la tension interfaciale ; des substances peuvent être inactives sur la tension superficielle (surface de séparation *eau-air*) et influencer considérablement sur la tension interfaciale (surface de séparation de deux corps non miscibles : *huile-eau*, ou *cellule-eau*, par exemple).

Les travaux de KREBS et NACHMANSON (1927), GELLHORN (1929) semblent établir que les substances capables de modifier la tension interfaciale peuvent pénétrer dans la cellule.

MORAWITZ (1910) HERZOG et BETZEL (1910), ABDERHALDEN et KURBEN (1921) retrouvent l'isotherme de l'adsorption dans des expériences sur les globules rouges et les Levures. Si on immerge des globules rouges dans des solutions de teneur croissante en protéides, la fixation ne croît pas avec la concentration, au contraire, cela s'explique par

l'agglutination qui diminue la surface active des globules. En détruisant les agglomérats par agitation, on retrouve la règle normale d'adsorption, à savoir que la quantité de substance fixée croît avec la concentration jusqu'à une certaine limite au-delà de laquelle la quantité fixée est indépendante de la quantité de corps adsorbable mise en œuvre.

Mais la théorie de l'adsorption n'explique pas tous les faits observés. En effet, des substances non adsorbables peuvent traverser la membrane.

THÉORIE DE RUHLAND

J'ai parlé plus haut de membrane fonctionnant comme tamis de molécules, hypothèse qui avait été émise par RUHLAND (1908) et KUSTER (1911-1918). Ces savants ont constaté que les colorants ne traversent pas la membrane des Végétaux si, dans l'eau, ils donnent une solution colloïdale. Par contre, lorsque le degré de dispersion atteint l'état moléculaire ou ionique, les colorants pénètrent dans la cellule. Dans ce cas, la vitesse de pénétration est fonction du volume moléculaire.

On retrouve les mêmes conclusions dans des recherches plus récentes [RUHLAND et HOFFMANN (1925), MOND et HOFFMANN (1928)].

On a objecté que des substances à volume moléculaire relativement petit (urée, glycolle) traversent très difficilement les cellules végétales (*Rheo-discolor*) et que, pour des colorants acides bien diffusibles, il y a pas de parallélisme entre la diffusion dans la gélatine et la pénétration dans la cellule.

THEORIE DE LA DIFFERENCE DE POTENTIEL

MICHAELIS admet que la perméabilité d'une membrane pour les particules en suspension dépend du diamètre des pores de la membrane et de la grandeur de la phase dispersée. Mais le savant allemand fait intervenir la charge électrique de la membrane et des particules.

Les membranes ont une charge dont la grandeur et le signe varient d'une membrane à l'autre (MICHAELIS, 1926). Les molécules traversent la membrane, mais il n'en sera pas toujours de même pour les ions, car, seuls les ions possédant une charge de signe contraire au signe de la membrane peuvent traverser celle-ci. Une membrane électro-positive est donc perméable aux ions à charge négative, c'est-à-dire aux anions. Inversement, une membrane électro-négative est perméable aux ions à charge positive c'est-à-dire aux cations.

MOND et HOFFMANN (1908), MATSUO (1923), HÖBER (1930) se rangent à cet avis après avoir expérimenté sur des membranes de collodion. Celles-ci primitivement électro-négatives laissent passer les cations. L'addition de Rhodamine change le signe de la membrane qui, alors, est perméable aux anions.

Pour démontrer le bien-fondé de sa théorie, MICHAELIS opère de la façon suivante : une solution très diluée de Rouge Congo est filtrée à travers un ultra-filtre. Le filtrat obtenu est incolore, mais le filtre est coloré en rouge : les pores du filtre paraissent trop étroits pour livrer passage aux micelles du colorant. Sur ce même filtre, MICHAELIS filtre du sérum dilué (avec de l'eau salée à 8 gr. 5 o/oo). Le filtrat obtenu dans cette seconde opération contient de l'albumine (traces) et offre une teinte rose.

Voici l'interprétation de MICHAELIS : le collodion se charge négativement au contact de l'eau, les particules de Rouge Congo sont elles aussi électro-négatives, il en résulte une répulsion qui s'oppose au passage des particules colorantes à travers les pores du filtre. Lorsque, postérieurement, le collodion (qui a retenu les particules de colorant) est mis en contact avec l'albumine, la charge de la paroi filtrante est modifiée, la répulsion électrique diminue ou devient nulle, le colorant traverse la membrane.

Pour la majorité des auteurs, les membranes ne laissent passer que les ions de charge de même signe : une membrane électro-négative est perméable aux anions, inversement, une membrane électro-positive est perméable aux cations. Les recherches effectuées sur l'analyse capillaire plaident en faveur de cette interprétation. W. OSTWALD (1919) plonge l'extrémité d'une bandelette de papier filtre dans une solution colloïdale, deux cas se présentent suivant le signe du colloïde : si le colloïde est chargé négativement, il monte le long du morceau de papier avec le liquide dispersif. Si le colloïde est chargé positivement, seul, le milieu de dispersion continue à monter, le colloïde s'élevant très peu au-dessus du niveau du liquide où plonge le papier filtre.

LASSEUR (1913), KOPACZEWSKI (1930) arrivent aux mêmes conclusions : *« les matières basiques dépassent à peine le niveau d'émergence du liquide coloré, tandis que les colorants acides montent à la même hauteur que l'eau »* (KOPACZEWSKI, p. 495).

Mais ce serait une dangereuse extrapolation que d'assimiler la membrane à une bandelette de papier.

Des faits récents signalés par BOUTARIC et DOLADILHE (1931) peuvent probablement être interprétés en faveur de l'hypothèse de MICHAELIS. Ces auteurs n'ayant pas fait d'examen microscopique, il est difficile de

savoir si le colorant a traversé la membrane ou s'il est fixé sur la membrane. Sous ces réserves, nous rappelons que : « *Lorsqu'un poids déterminé de racine ou de feuille, préalablement pilées, est introduit dans la solution aqueuse d'une matière colorante, deux cas sont à envisager :*

a) *Si la matière colorante est colloïdale et de signe négatif ou semi-colloïdale acide, elle ne se fixe pas ou se fixe en quantité peu appréciable ;*

b) *Si la matière colorante est colloïdale et de signe positif ou semi-colloïdale basique, on observe sa fixation »* (p. 1039, 1931).

THEORIE DE LA MEMBRANE COMPLEXE.

On peut concevoir l'existence de membranes compliquées. C'est ainsi que R. HÖBER envisage le cas théorique d'une membrane constituée par une mosaïque de particules perméables aux cations (collodion) et de parties perméables aux anions (*collodion-rhodamine*). Une solution de chlorure de potassium étant placée d'un côté de la membrane, de l'eau distillée se trouvant de l'autre côté, le chlorure de potassium ne diffusera vers l'eau distillée que lorsqu'on aura ajouté à celle-ci un sel dont les ions sont interchangeables avec le chlorure de potassium.

THEORIE DE PIERRE GIRARD.

Aucune des théories résumées ne peut expliquer tous les faits observés. Aussi Pierre GIRARD a-t-il proposé une théorie de la perméabilité extrêmement séduisante en ce sens que, tout en considérant la membrane comme un tamis, il fait intervenir les notions d'adsorption sélective et de polarisation de la paroi. Ces conceptions sont magistralement exposées dans le rapport de Pierre GIRARD au Troisième Congrès international de Chimie SOLVAY. L'auteur établit une relation étroite entre le glissement des « *veines liquides* » (quel qu'en soit le sens) à travers les interstices capillaires des membranes et la polarisation de ces dernières. Pour Pierre GIRARD, la perméabilité d'une membrane est sous la dépendance exclusive du processus d'adsorption.

« 1) *S'il s'agit de molécules entières non ionisées, l'adsorption du solvant aurait pour effet, d'après les théories récentes, de diminuer la section des conduits capillaires qui traversent la membrane dans son épaisseur, en sorte que les molécules les plus petites (celles du solvant, s'il s'agit de l'eau) puissent seules s'y engager, les molécules du corps dissous, supposées d'un plus grand diamètre, se trouvant arrêtées au passage.*

2) S'il s'agit d'électrolytes, c'est l'adsorption élective d'une certaine sorte d'ions (conformément aux règles formulées par J. PERRIN) par les parois intérieures des conduits capillaires et les conséquences électrostatiques, répulsion ou attraction, que comporte cette adsorption élective qui commandent la différence des vitesses des ions dans le passage de ces conduits (1). »

« 3) La polarisation de la paroi, dont l'un des facteurs est précisément l'inégal obstacle opposé à la diffusion des différents ions (l'apparition d'une force contre-électromotrice de filtration constituant l'autre facteur), comporte des conséquences électrosmotiques qui sont remarquables en ce qu'elles permettent d'interpréter les osmose négatives. »

« 4) Le « tri » ionique effectué par la paroi polarisée comporte également des conséquences chimiques :

A) La nécessité que soit conservé à l'intérieur des deux phases liquides que la membrane sépare, l'équilibre électrostatique, implique la dissociation de certaines molécules (molécules d'eau ou molécules dissoutes) en constituants ionisés se répartissant entre ces deux phases. Ainsi peut s'expliquer, pour des cellules vivantes (par exemple les cellules actives des glandes gastriques), la possibilité d'élaborer HCl à partir de NaCl et CO₂ ou H₂O.

B) D'autre part, l'étude du phénomène de César BECQUEREL nous met en présence de processus d'oxydo-réduction dont le mécanisme s'explique en supposant l'existence d'ions (H₂O)— en équilibre statique avec certains anions. La membrane intervient ici comme catalyseur physique. Sa perméabilité sélective aux ions et le processus électrosmotique, que la polarisation conditionne, entraînant la rupture de cet équilibre, et, conséquemment, l'apparition de produits d'oxydation et de produits de réduction qui ne prendraient pas naissance par réaction directe d'un des milieux sur l'autre. » (Pierre GIRARD, 1929).

*
**

Il faut se garder de généralisations trop hâtives dans le problème si complexe de la perméabilité; il est peut-être préférable d'analyser un ensemble de cas simples, élémentaires, c'est-à-dire étudier l'action des différents facteurs régissant la perméabilité.

(1) « On peut concevoir, il est vrai, que la paroi intérieure des conduits capillaires soit chargée d'un certain signe par dissociation superficielle; mais celle-ci, le plus souvent, amorcera l'adsorption sélective d'une certaine sorte d'ions (d'ions polyvalents principalement), d'un signe inverse, présents dans la solution. »

Facteurs régissant la perméabilité de la membrane

La multiplicité des facteurs régissant la perméabilité de la membrane nous oblige à exposer brièvement ceux dont l'importance nous paraît la moins grande. Nous insisterons au contraire sur ceux qui, à notre sens, jouent le rôle le plus considérable.

VOLUME MOLÉCULAIRE.

Les recherches de RUHLAND et HOFFMANN (1925) tendent à établir une relation étroite entre le volume moléculaire d'une substance et sa vitesse de pénétration à l'intérieur d'une cellule. Comme nous l'avons vu plus haut, ce fait n'est pas susceptible de généralisation.

DEGRÉ DE DISPERSION.

Les expériences effectuées en vue de rechercher une relation entre le degré de dispersion d'une solution colorante et son pouvoir de pénétration dans la cellule ont donné des résultats très discordants. Cela tient sans doute à la non conformité de la désignation des matières colorantes dans le commerce (LASSEUR, DUPAIX, GEORGES, 1932) ou aux impuretés qui accompagnent ces produits (SERRA, 1932).

De plus, les auteurs ne paraissent pas avoir tenu compte de l'âge des solutions colorantes (LASSEUR, DUPAIX, GEORGES, 1932; SERRA (1932) (1) et le degré de dispersion n'a pas été déterminé avec une grande précision (BENOIST, GOLBLIN, KOPACZEWSKI, 1929).

CHARGE ÉLECTRIQUE.

Il existe une différence dans la vitesse de pénétration des colorants basiques et des colorants acides dans la cellule. Pour BENOIST, GOLBLIN, et KOPACZEWSKI: « *il ne s'agit ni de la nature, ni de la composition chimique, mais de la charge électrique, déterminée expérimentalement.... Une trace d'un ion polyvalent peut, avec la plus grande facilité, changer le signe électrique de la matière colorante...., cela est surtout vrai pour les colorants colloïdaux.* » (BENOIST, GOLBLIN, KOPACZEWSKI, 1919, p. 486). Ces auteurs ont étudié comparativement la vitesse de pénétration de soixante-treize colorants dans des cellules animales et des cellules végétales. « *La cellule végétale se laisse pénétrer par les colorants acides d'un grand degré*

(1) « *La valeur de la tension de surface totale des dispersoïdes dépend de l'âge* » (W. OSTWALD, 1919, p. 66).

de dispersion, tandis que la cellule animale se colore surtout, sinon exclusivement, par les colorants positifs sans égard pour leur degré de dispersion ». (BENOIST, GOLBLIN, KOPACZEWSKI, 1919, p. 509).

Ces remarques nous conduisent naturellement à envisager l'influence de la réaction du milieu, car il est extrêmement facile d'invertir, même involontairement, le signe électrique d'un colloïde (BENOIST, GOLBLIN, KOPACZEWSKI).

INFLUENCE DU pH.

En première approximation, la réaction acide favorise la pénétration des colorants acides et retarde celle des colorants basiques. En faisant varier le pH du milieu extérieur, RHODE (1917) colore la cellule par les colorants acides ou par les colorants basiques. La variation du pH détermine soit la coagulation des colloïdes, soit l'hydratation [cette hydratation est très nette pour les Bactéries se décolorant rapidement par la méthode de GRAM. (LASSEUR, DUPAIX, OLIVIER, 1931)]. Il en résulte des modifications de perméabilité de la membrane.

Etant donné un ion déterminé, BETHE (1909-1914-1916-1922-1923) et IRWIN (1926) remarquent que la perméabilité augmente ou diminue suivant que le pH s'approche ou s'éloigne du point isoélectrique de la membrane.

Les admirables recherches de LOEB et MICHAËLIS ont précisé la notion de point isoélectrique des solutions colloïdales. Mais, quand il s'agit de Bactéries, il semble que la position du point isoélectrique varie sensiblement avec l'état de la plastide (LASSEUR, DUPAIX, 1931; LASSEUR, DUPAIX, GEORGES, 1932). Pour KOPACZEWSKI, le point isoélectrique « *n'est pas fixe, il n'est pas le seul* » (1931, p. 271).

Il semble résulter des travaux de LLOYD, FREE, HAYNES (1915-1918) qu'au point isoélectrique, la perméabilité est maximum, le gonflement étant minimum. GELLHORN est d'avis contraire.

La membrane des globules rouges est électro-positive et perméable aux anions (1), c'est du moins l'avis de MOND. Ce savant pense changer le signe de la membrane par addition d'ions OH—. Lorsque le pH du milieu dispersif atteint une valeur de 8, les cations peuvent traverser la membrane il y a échange entre les ions Na+ du milieu dispersif et les ions K+ de l'intérieur de la cellule.

(1) L'imperméabilité des hématies aux cations est peu vraisemblable (Pierre GIRARD, *Congrès international de Chimie SOLVAY*, 1929, p. 301; LASSEUR, DUPAIX, GEORGES, 1932, p. 71).

WEBER, au cours de ses belles recherches sur la plasmolyse, attribue les transformations réversibles de viscosité qu'il observe, aux variations du pH intérieur des cellules.

Pierre GIRARD envisage le cas théorique d'une membrane M située entre deux solutions S_1 et S_2 ionisées, en relation d'échange; et dans la membrane, Pierre GIRARD considère un seul tube capillaire.

1° Si la paroi interne du tube capillaire n'a pas de « revêtement électrique », elle n'adsorbe électivement aucun des ions présents dans la solution. Les deux solutions diffusent librement l'une vers l'autre.

2° Supposons que la paroi interne « de chaque tube fixe électivement des cations H^+ , le potentiel de cette paroi se trouve de la sorte accru par rapport à la solution. Dans ces conditions, les cations de la solution concentrée ne diffuseront que plus difficilement à travers les conduits étroits dont les parois sont « revêtues » de charges positives; d'autant plus difficilement que leur valence sera plus élevée et que le champ sera plus intense, c'est-à-dire que le diamètre des canalicules sera plus petit. Ces cations s'accumuleront au voisinage de la face du septum baignée par la solution concentrée, cependant que le passage des anions vers le milieu de diffusion se trouvant, au contraire, facile, ces anions s'accumuleront au niveau du front de diffusion, c'est-à-dire sur la face opposée du septum, baignée par la solution la plus diluée.

Ajoutons dès maintenant que, le long du tunnel que représente chaque capillaire, ces anions « revêtiront » à leur tour de charges négatives la veine liquide qui remplit le tunnel. Le « revêtement » positif de la paroi intérieure de chaque capillaire, et le « revêtement » négatif de la veine liquide qui le remplit constituant la « couche double » d'HELMHOLTZ » (Pierre GIRARD, 1928, p. 263).

TENSION SUPERFICIELLE.

L'influence des variations de tension superficielle sur la perméabilité de la membrane a suscité de nombreux travaux.

En 1910, CZAPEK, expérimentant sur les Levures, pense qu'il existe une tension superficielle critique (1).

W. ARCIZEWSKI, E. CZARNECKI, W. KOPACZEWSKI, et W. SZUKIEWICZ, (1928) étudiant les phénomènes électro-capillaires, montrent que « la tension superficielle basse constitue un facteur favorable à la pénétration capillaire des substances diverses » (p. 355).

(1) 38 dynes/cm. environ, la tension superficielle de l'eau étant 76 dynes/cm.

Une relation étroite entre la narcose et la tension superficielle a été établie par TRAUBE (1905). KOPACZEWSKI conclut aussi à l'existence « *d'un parallélisme entre les doses narcotiques et le degré d'abaissement de la tension superficielle* » (p. 14, 1929). J. RÉGNIER (1925), après une série de recherches fondamentales, retrouve l'action de la tension superficielle sur la narcose, mais « *cette influence est petite* » (p. 87, 1925).

NEUSCHLOSZ (1920) augmente la tension superficielle d'une solution de lécithine par addition de Ca^{++} , il constate que la forme des pores varie avec la tension superficielle.

KNOEVENAGEL (1921) et LASSEUR, DUPAIX, GEORGES (1932), établissent une relation entre la tension superficielle et les phénomènes de gonflement.

MUND, au cours de la discussion du Rapport de Pierre GIRARD (au Troisième Congrès international de Chimie SOLVAY) relative à la perméabilité sélective des membranes, a attiré l'attention sur le rôle important que doit jouer la tension superficielle dans ces processus : « *...je désirerais montrer à titre d'exemple que la tension superficielle des deux liquides (solution et solvant) pourrait ici jouer un rôle. Si la tension superficielle du dissolvant pur au contact de la phase solide (la membrane) est inférieure à la tension superficielle de la solution, on peut concevoir que dans un canal capillaire reliant les deux liquides, se produira le phénomène suivant : au voisinage de la paroi et jusqu'à une distance δ de celle-ci, égale à l'épaisseur de la couche modifiée par les propriétés superficielles, la différence des tensions superficielles se traduira par une force tangentielle déterminant le glissement de la couche dans la direction allant du dissolvant vers la solution. A l'intérieur de cette couche périphérique, une veine liquide centrale cheminera en sens inverse, de manière à annuler la dénivellation entre les deux liquides que le phénomène précédent tendrait à produire. Toutefois, si le rayon ρ du pertuis capillaire diminue, il faut, puisque δ est constant et puisque $\rho - \delta$ représente le rayon du cylindre central que ce dernier diminue lui aussi et qu'il finisse par disparaître. Pour toutes les valeurs de ρ inférieures à δ , la membrane se comportera donc comme hémiperméable* » (p. 46-47).

Pierre GIRARD reconnaît que l'on a peut-être trop négligé le facteur tension superficielle en ce qui concerne les non-électrolytes.

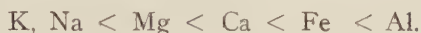
ACTION DES ÉLECTROLYTES SUR LA PÉNÉTRATION DES COLORANTS.

Les travaux de BOUTARIC et DOLADILHE (1931) démontrent d'une façon irréfutable l'action des électrolytes sur la fixation des colorants par les cellules végétales.

« a) Si la matière colorante est colloïdale et électro-négative et par suite ne se fixe pas à l'état pur sur les divers supports utilisés, l'introduction d'un électrolyte dans la solution provoque sa fixation. Cette action favorable exercée par l'électrolyte est d'autant plus nette que sont plus élevées la concentration et la valence de l'ion électro-positif de l'électrolyte introduit.

b) Si la matière colorante est colloïdale et électro-positive et par conséquent se fixe à l'état pur sur les divers supports utilisés, l'introduction d'un électrolyte dans la solution colorante exerce une action défavorable sur sa fixation. Cette action défavorable est d'autant plus nette que sont plus élevées la concentration et la valence de l'ion électro-positif de l'électrolyte introduit » (p. 1039-1040, 1931).

L'influence des électrolytes sur la pénétration des colorants dans la cellule a suscité de nombreuses recherches. Il résulte de ces essais que la force d'action des ions dépend de leur valence : la pénétration du Violet de méthyle dans une Algue (*Spirogyra*) est retardée dans le sens de la série suivante :



De plus, il faut faire intervenir la concentration de la solution en électrolyte.

ACTION DES ÉLECTROLYTES SUR LA PÉNÉTRATION DES ÉLECTROLYTES.

Des travaux nombreux semblent établir l'existence de deux séries d'ions : l'une de cations, l'autre d'anions (1).

1° $K > Na > Li > Mg > Ba > Ca$;

2° $I > Br > NO_3 > Cl > \text{tartrate} > SO_4 > \text{citrate}$.

(1) E. F. BURTON rappelle différentes séries montrant le pouvoir coagulant relatif de quelques ions pour des albumines.

Sol.	Auteurs	Pouvoir coagulant
Albumine	BANCROFT	$Th = UO_2 > Cu = Zn > Ca > Mg > Li > K = Na > NH_4$.
Albumine (réaction alcaline)	HOFMEISTER	$Sulfocyanate > I > ClO_3 > NO_3 > Cl > Acétate > Citrate > PO_4 > SO_4 > Tartrate$.
Albumine (réaction alcaline)	BANCROFT	$Sulfocyanate = I > ClO_3 > NO_3 > Cl > Acétate > PO_4 > SO_4 > Tartrate$.
Albumine (réaction acide)	PAULI	$Sulfocyanate > I > Br > NO_3 > Cl > Acétate$.

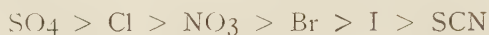
(E.-F. BURTON, p. 185, 1921.)

1^o *Série des cations.* — La pénétration d'un sel dans une cellule est retardée par la présence d'un sel quelconque dont le cation se trouve, dans la série, à droite du premier sel considéré. Par exemple, la pénétration d'un sel de sodium est retardée par la présence d'un sel de lithium, de magnésium, de baryum, de calcium. Plus la distance qui sépare les deux cations dans la série est grande, plus l'effet retardant est prononcé. C'est ainsi que le calcium retarde plus la pénétration du sodium que le magnésium.

2^o *Série des anions.* — Avec les anions, nous observons un effet inverse de celui que nous venons de signaler pour les cations. L'effet favorisant est d'autant plus grand que la distance qui sépare deux anions dans la série est grande.

PHÉNOMÈNE PHYLÉTIQUE DE BOAS.

BOAS (1) étudie l'action de différents sels neutres sur des cultures mixtes de Bactéries et de Champignons. Le savant allemand admet l'existence de deux séries d'anions : une série bactériotrope :



et une série mycotrope :



Les anions SCN— et SO₄— se montrent particulièrement intéressants en ce sens qu'ils permettent respectivement la croissance presque exclusive des Champignons ou des Bactéries.

EQUILIBRE DE DONNAN.

DONNAN (1911) a proposé une interprétation assez simple d'une série de faits inexplicables jusqu'alors, c'est la théorie d'équilibre de membrane.

Si une membrane M sépare deux solutions aqueuses A et B, deux cas peuvent se présenter :

1^o Les deux solutions A et B contiennent chacune un électrolyte E capable de diffuser à travers la membrane. Les ions de l'électrolyte auront la même concentration en A et B quand l'équilibre sera atteint.

2^o L'une des solutions ou les deux solutions renferment des ions (ou des micelles) qui ne peuvent pas traverser la membrane. Il s'établira entre les deux solutions un état d'équilibre qui est régi par deux lois :

(1) La diffusion des travaux de BOAS a été assurée, en France, par la traduction de KOENIG.

A) La somme de tous les ions positifs doit être égale à la somme de tous les ions négatifs.

B) Les rapports des concentrations des divers cations dans les solutions A et B doivent être égaux. De plus la concentration des anions est inversement proportionnelle à la concentration des cations.

Le célèbre savant anglais admet :

« a) La non diffusibilité de certains constituants électriquement chargés (ions simples, ions colloïdaux ou micelles portant des ions adsorbés) » ;

b) La nécessité pour les ions diffusibles de traverser la membrane en quantités équivalentes.

Considérons par exemple, le cas où la solution A contient seulement NaCl, tandis que B contient à la fois NaCl et l'électrolyte colloïdal NaR dont l'anion (ou la micelle chargée négativement) R ne peut traverser la membrane. Nous supposerons cette dernière perméable aux molécules d'eau et aux ions Na+ et Cl—. Les deux conditions de contrainte sont ici :

a) La non-diffusibilité de R ;

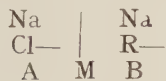
b) La nécessité pour les ions Na et Cl— de diffuser ensemble et en quantités équivalentes.

Prenons un autre exemple : soient A et B respectivement des solutions de Na R et K R. Les deux conditions de contrainte sont alors :

a) La non-diffusibilité de R ;

b) La diffusion simultanée des ions Na+ et K+ dans des directions opposées mais en quantités équivalentes. »

Soient deux solutions A et B, séparées par une membrane M. La solution A contient Na Cl, la solution B, Na R (R étant non diffusible). L'état initial sera représenté ainsi :



et l'état final :



Il en résulte une influence considérable de la substance Na R sur la distribution de Na Cl. DONNAN ne conçoit pas un élément vivant sans protéines. Ces protéines, il les assimile à la substance Na R.

La théorie de DONNAN, séduisante par sa simplicité, ne satisfait pas tous les savants et en particulier Pierre GIRARD, car elle ne fait jouer

aucun rôle actif à la membrane. Au point de vue biologique, « *il s'agit rarement d'états d'équilibre, mais de systèmes qui tendent vers un équilibre qui n'est pas atteint* » (Pierre GIRARD, p. 40).

Le rôle de la membrane semble indéniable à J. DUCLAUX. L'éminent biologiste écrit : « *Dans le règne animal comme dans le règne végétal, les membranes jouent le rôle de filtres spécialisés et très habiles.*

Leur structure micellaire explique comment elles peuvent le jouer. Nous avons déjà vu les gelées micellaires se comporter comme des filtres extrêmement serrés. Même si leur rôle était exclusivement mécanique, si elles se comportaient simplement comme une couche de sable très fin, elles seraient en mesure de séparer les grosses molécules et les petites, laissant passer les dernières et arrêtant les premières... Comme d'ailleurs, il y a des micelles de toute grosseur, rien d'étonnant à ce que deux membranes filtrantes de même organisme aient des propriétés différentes l'une de l'autre.

Mais le rôle des micelles ne s'arrête pas là: elles sont susceptibles d'adsorption, ce qui diversifie encore leur nature.

Tout d'abord, l'adsorption réagit sur leurs propriétés filtrantes.... Elle peut, ainsi, conférer à la membrane un rôle de protection vis-à-vis des cellules qu'elle recouvre: une substance nuisible adsorbée par la membrane, ne pourra arriver jusqu'à la partie vivante des cellules » (p. 197-198, 1920).

Les deux ions d'un sel qui traversent une membrane franchissent-ils celle-ci en quantité chimiquement équivalente, conformément à la « *représentation de NERNST dans sa théorie de la diffusion d'un électrolyte dissocié* » ? ou bien n'y a-t-il pas rupture de cette équivalence au niveau de la membrane, l'un des « *des deux ions franchissant seul l'obstacle ou tout au moins en proportion nettement prépondérante par rapport à l'ion de signe inverse* » ? Telle est la question que se posent Pierre GIRARD et MESTREZAT. Et, à la suite de leurs remarquables recherches sur la perméabilité de la cornée (1922) les deux savants français sont conduits à admettre que « *la perméabilité d'un tissu vivant et, très vraisemblablement celle des parois cellulaires, est une perméabilité ionique essentiellement sélective* ».

DISSOCIATION ÉLECTROLYTIQUE.

Les acides et les bases peu dissociés traversent plus facilement la membrane que les acides et les bases fortement dissociés.

COEFFICIENT DE TEMPÉRATURE.

On a trouvé une valeur élevée du coefficient de température dans certaines expériences relatives à la pénétration des colorants à l'intérieur des cellules.

INFLUENCE DE LA CONCENTRATION.

Dans les recherches d'IRWIN on retrouve l'influence de la concentration (1) du colorant sur la perméabilité des membranes. De fortes concentrations peuvent tuer l'élément anatomique. Or, depuis les travaux de GALEOTTI (1902-1903) on sait que la perméabilité des membranes mortes diffère de celle des membranes vivantes. C'est ainsi que les plastides mortes se colorent plus intensivement que les plastides vivantes.

AUTRES FACTEURS D'ACTION.

La perméabilité de la membrane est encore sous la dépendance de nombreux facteurs, les uns inhérents au milieu extérieur, les autres à la membrane elle-même. Parmi les premiers, nous citerons l'excitation provoquée par les courants électriques (HÖBER), l'action des narcotiques (ANSELMINO, 1927), l'altération de la membrane (HÖBER, 1930), le temps de contact de la membrane avec la solution qui la traverse (2), la composition du milieu nutritif dans le cas des cultures bactériennes (LASSEUR, DUPAIX, 1931); et parmi les seconds, il faut envisager: l'espèce (HÖBER et PUPILLI, 1931), la race, l'individu qui ont fourni les cellules, et, pour un même individu, l'âge de la membrane (MAC DOUGAL; LASSEUR et DUPAIX, 1931).

Le problème de la perméabilité de la membrane apparaît de plus en plus complexe. Certes, il ne faut pas espérer en trouver une solution simple. La chimie-physique est incapable à elle seule d'expliquer tous les processus biologiques.

(1) R. S. LILLIE a constaté une diminution notable de la pression osmotique de l'albumine quand la concentration en sulfocyanure de potassium passe de $\frac{M}{48}$ à $\frac{M}{24}$ (in OSTWALD, *Colloid chemistry*, p. 257, 1919).

(2) La vitesse de diffusion décroît avec le temps (MICHAELIS), il y aurait là un coïncement de molécules analogue au phénomène décrit par HARKINS (1916), LANGMUIR (1922) et G. GENIN (1928).

Influence du Sulfocyanure de potassium sur différents phénomènes biologiques

Généralités

L'action sélective de certains ions est bien connue depuis les belles recherches de BOAS. Lorsqu'on ensemence un milieu nutritif avec une suspension renfermant une Bactérie et un Champignon, il est possible de faire dominer l'un ou l'autre de ces microorganismes, il suffit pour cela d'apporter une quantité convenable d'un ion déterminé. L'expression « *d'ion déterminé* » implique que tous les ions ne se comportent pas de la même façon vis-à-vis des Champignons et des Bactéries. Si l'on classe les ions d'après leur action relative sur un organisme donné, on obtient des séries, des rangées d'ordre croissant ou d'ordre décroissant. BOAS observe le plus souvent la rangée phylétique suivante :

SCN, I, Br, NO₃, Cl, SO₄, rangée bactériotrope.

→
SO₄, Cl, NO₃, Br, I, SCN ; rangée mycotrope.

Malheureusement, les faits ne sont pas toujours aussi simples, une complication surgit avec la concentration : l'ordre des séries peut être modifié ou même renversé lorsqu'on fait varier la concentration.

Pour expliquer ces faits, BOAS pose en principe que : « *la rangée théorique des anions de la physico-chimie est fondée sur l'hydratation des ions. Aussi au point de vue biologique il est évident qu'il faut attribuer l'action des ions à l'hydratation, car en fin de compte tous les processus cellulaires se produisent sous l'influence de la distribution aqueuse (eau dynamique et statique), et l'importance de l'eau, de l'hydratation et du pouvoir d'adsorption qui s'y associe doit être placée au premier rang comme la base des processus vitaux* (p. 17) ...On ne peut naturellement pas tout rapporter exclusivement à l'hydratation des ions. Mais c'est la dernière base d'explication.

Par conséquent je reviens, malgré maintes hésitations, à cette finalité comme base d'explication englobant tout » (p. 18).

Parmi les anions que BOAS a utilisés, l'anion SCN— nous a paru particulièrement intéressant en ce sens qu'il permet la croissance des Champignons à l'exclusion (1) de celle des Bactéries.

L'étude des faits implique la réalité de leur existence. C'est en s'inspirant de cette idée que LASSEUR et ses Collaborateurs (1931) ontensemencé de la terre de jardin en eau peptonée additionnée de doses croissantes de sulfocyanure de potassium.

Les résultats obtenus par ces auteurs sont absolument conformes aux faits décrits par BOAS.

Cette action sélective de l'ion SCN— se retrouve encore lorsque LASSEUR, DOMBRAY et MOREL substituent à la terre de jardin des mélanges de composition connue.

Les faits décrits par BOAS sont exacts

La découverte de BOAS est de date assez récente pour qu'il ne soit peut-être pas superflu de multiplier les expériences établissant dûment sa réalité. Aussi résumerai-je tout d'abord quelques expériences confirmant, elles aussi, dans leurs grandes lignes les conclusions du savant biologiste allemand.

Dans cet exposé j'envisagerai successivement : la technique utilisée (matériel microbien, milieux de culture, préparation des suspensions, protocole d'expérience, etc....).

RECHERCHES PERSONNELLES

TECHNIQUE.

Choix du matériel bactérien. — L'expérience proprement dite doit être précédée d'essais ayant pour but de cultiver diverses espèces de Champignons dans de l'eau peptonée additionnée de sulfocyanure de potassium. En effet, il faut absolument éliminer du cadre de cette expérimentation tous les Champignons produisant dans les milieux de culture un trouble analogue à celui que provoquent les Bactéries. Si, dans de nombreux cas,

(1) Ou du moins à l'exclusion presque totale.

l'échelle macroscopique ne suffit pas pour ramener *a priori* une culture microbienne soit au groupe des Bactéries, soit à celui des Champignons, il faut reconnaître que, par la formation de colonies filamenteuses, en étoilles, en flocons radiés, certains microorganismes s'inscrivent d'eux-mêmes dans la catégorie des Champignons. Il s'agit là d'une première approximation qui doit être complétée par un examen microscopique. Il n'en reste pas moins vrai que lorsqu'on examine une centaine de tubes, il y a un gros intérêt à expérimenter sur des germes dont l'aspect de culture facilite un premier classement.

C'est pour cette raison que BOAS évite l'emploi des espèces microbiennes déterminant « *un trouble rapide dans les milieux nutritifs* » (p. 25).

La présence d'un trouble provoqué par les Champignons complique l'expérimentation mais ne l'entache pas d'erreur. Il n'en est pas de même de l'existence d'un antagonisme entre les germes expérimentés. En négligeant cette précaution essentielle, on risquerait d'attribuer à l'ion SCN— un empêchement de croissance dû au développement d'espèces concurrentes.

Pour réaliser une culture mixte, il faut tenir compte non seulement de l'antagonisme possible entre les espèces microbiennes expérimentées, mais encore il faut faire intervenir le nombre ou la proportion relative des éléments microbiens mis en œuvre. Supposons que l'on ensemence deux germes A et B (germes offrant un certain antagonisme) dans la proportion de 1 A + 9 B ou de 9 A + 1 B, il est bien évident que les résultats pourront être fondamentalement différents dans les deux cas. Pour affirmer que le Champignon prédomine sur la Bactérie, il est bon de savoir l'ordre de grandeur du nombre de germes expérimentés ; c'est pour cela que nous nous sommes adressés à des Champignons donnant facilement des suspensions relativement homogènes, c'est-à-dire constituées surtout par des éléments isolés et non par un feutrage.

C'est en tenant compte de ces remarques que nous avons réalisé toute une série de mélanges répondant au schéma général suivant :

Champignon + Bactérie « *prenant le GRAM* », + Bactéries chromogènes « *ne prenant pas le GRAM* ».

Milieux de culture ; préparation des suspensions. — Les Champignons sont cultivés sur moût gélosé à 3 % de pH = 5,5 et les Bactéries sur peptone gélosée (concentration en peptone : 2 %, en gélose : 3 %) de pH = 7. Suivant les exigences des germes, les cultures sont effectuées à la température du laboratoire ou à la température de 37° C.

Les cultures âgées de 40 heures sont recouvertes d'eau physiologique.

On réalise ainsi des suspensions qui servent à préparer les mélanges microbiens expérimentés (1). Les détails relatifs à ces opérations seront donnés page . J'indique ci-dessous le protocole général d'expérience :

TABLEAU I

Protocole d'expérience.

DÉSIGNATION	EAU	SOLUTION	EAU	SUSPENSION
des tubes	peptonée	de sulfocyanure de potassium N/1	physiologique	microbienne
a	1 cm ³	0,2 cm ³	7,8 cm ³	0,2 cm ³
b	1	0,4	7,6	0,2
c	1	1	7	0,2
d	1	2	6	0,2
e	1	4	4	0,2
f	1	6	2	0,2
Témoin	1	0	8	0,2

Solution peptonée. — La solution peptonée (concentration en peptone : 5 %) de pH = 7 préparée suivant la technique habituelle des laboratoires doit être rigoureusement limpide.

Solution de sulfocyanure de potassium. — Nous avons employé une solution normale de sulfocyanure de potassium (2).

Dans nos premiers essais nous ajoutions aseptiquement la solution de sulfocyanure de potassium tyndallisée au milieu nutritif (3). L'expérience ayant montré que la tyndallisation était sans action sur le titre des solutions de sulfocyanure, nous avons, dans les recherches ultérieures, ajouté la solution de sulfocyanure de potassium au mélange eau physiologique-eau peptonée et soumis le tout à la tyndallisation.

RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX.

Nous résumons dans les tableaux suivants quelques-uns des résultats obtenus au cours de ces recherches.

(1) La concentration des suspensions doit être telle que les corps microbiens ensemencés ne déterminent pas de trouble appréciable dans le milieu nutritif.

(2) Détermination du titre de la solution par la méthode de CHARPENTIER-VOLHARD. Dosages effectués au Laboratoire de M. le Professeur CORDEBARD.

(3) La tyndallisation ne change pas le titre de la solution de sulfocyanure de potassium; ce fait confirme les observations faites depuis longtemps en Chimie, sur la stabilité remarquable des sulfocyanures.

TABLEAU II

Influence du sulfocyanure de potassium sur le développement
d'une population microbienne P₁.

Mélangeensemencé:

Schizosaccharomyces octosporus.
B. pyocyaneus pyocyanogenes.
B. prodigiosus.
B. balticus.
B. mesentericus niger.

DÉSINATION des tubes	ASPECT DES CULTURES	
	Après 4 jours	Après 7 jours
a	Trouble (1), grumeaux	Trouble.
b	Trouble, grumeaux.	Trouble.
c	Trouble, grumeaux.	Trouble.
d	Limpide, quelques flocons radiés.	Limpide, flocons radiés (2).
e	Limpide, très rares flocons radiés.	Limpide, flocons radiés.
f	Limpide.	Limpide, flocons radiés.
Témoin	Trouble, voile, grumeaux.	Trouble, voile, grumeaux.

TABLEAU III

Influence du sulfocyanure de potassium sur le développement
d'une population microbienne P₂.

Mélangeensemencé:

Mycoderma lactis Baarn.
B. pyocyaneus pyocyanogenes.
B. prodigiosus.
B. mesentericus niger.

DÉSIGNATION des tubes	ASPECT DES CULTURES	
	Après 4 jours	Après 7 jours
a	Trouble (1).	Trouble, voile.
b	Trouble.	Trouble, voile.
c	Léger trouble, flocons.	Léger trouble.
d	Limpide, flocons (2).	Limpide, voile, flocons.
e	Limpide, flocons.	Limpide, flocons.
f	Limpide, rares flocons.	Limpide, flocons.
Témoin	Trouble, voile.	Trouble, voile.

(1) Le trouble va. en décroissant de a à c.

(2) Le nombre de flocons diminue de d à f.

TABLEAU IV

Influence du sulfocyanure de potassium sur le développement d'une population microbienne P₃.

Mélange ensemencé :

Nadsonia elongata,
*B. pyocyaneus pyocyano*genes,
B. prodigiosus,
B. balticus,
B. mesentericus niger.

DÉSIGNATION des tubes	ASPECT DES CULTURES	
	après 4 jours	Après 7 jours
a	Trouble (1) voile rose.	Trouble, dépôt.
b	Trouble, voile rose.	Trouble, dépôt.
c	Trouble.	Trouble, dépôt.
d	Limpide, fins flocons.	Limpide, fins flocons.
e	Limpide, fins flocons.	Limpide, fins flocons.
f	Limpide.	Limpide.
témoin	Trouble, pellicule rouge.	Trouble, pellicule rouge.

L'examen de ces tableaux montre que l'ion SCN— s'oppose au développement des Bactéries lorsqu'il atteint une concentration convenable dans le milieu nutritif. Par contre, les Champignons ne paraissent pas notablement influencés dans nos conditions d'expérience (2) par le sulfocyanure de potassium. Il en résulte des différences d'aspect très grandes entre les cultures a, b, c, et les cultures d, e, f. On observe des faits en tous points superposables lorsqu'on expérimente avec les mélanges ci-dessous :

- 1° *Schizosaccharomyces octosporus*, *B. pyocyaneus pyocyano*genes, *B. prodigiosus*, *B. mesentericus niger*.
- 2° *Schizosaccharomyces octosporus*, *B. pyocyaneus pyocyano*genes, *B. balticus*, *B. mesentericus niger*.
- 3° *Mycoderma lactis*, *B. pyocyaneus pyocyano*genes, *B. prodigiosus*, *B. mesentericus niger*.
- 4° *Mycoderma lactis*, *B. pyocyaneus pyocyano*genes, *B. balticus*, *B. mesentericus niger*.
- 5° *Nadsonia elongata*, *B. pyocyaneus pyocyano*genes, *B. prodigiosus*, *B. mesentericus niger*.
- 6° *Nadsonia elongata*, *B. pyocyaneus pyocyano*genes, *B. balticus*, *B. mesentericus niger*.

L'ensemble de ces résultats confirme l'existence de l'action sélective de l'ion SCN—, telle qu'elle a été décrite par BOAS. Mais il ne suffit pas d'ob-

(1) Le trouble va en décroissant de a à c.

(2) Du moins à l'échelle macroscopique.

server des faits, il faut encore chercher à les interpréter, aussi le savant biologiste allemand propose-t-il l'explication suivante: « *il semble qu'il existe entre les Bactéries et les mycoses, au point de vue colloïdo-chimique une plus grande différence dans le degré d'hydratation, de telle sorte que les Bactéries sont toujours plus fortement gonflées ou plus sensibles au gonflement que les mycoses; par conséquent les Bactéries disparaissent plus facilement sous l'influence du fort gonflement produit par l'ion sulfocyanique* » (p. 17).

Etude du mécanisme du phénomène de BOAS

Le gonflement des plastides ou des cellules se traduit nécessairement par une augmentation de volume des corps microbiens, c'est la raison pour laquelle nous avons institué une série d'expériences destinées à mettre en évidence les variations de volume des corps microbiens (Bactéries et Champignons) sous l'action de l'ion SCN—. Afin de voir dans quelle limite le sulfocyanure de potassium modifie la perméabilité de la cellule, nous avons fait agir le sulfocyanure de potassium en présence d'un colorant. Des appareils de mesure nous ont permis d'évaluer la quantité de colorant fixée par les corps microbiens.

Les variations de volume des plastides et de fixation du colorant par ces mêmes éléments ont été déterminées non seulement à un pH donné, mais à toute une série de pH allant de pH = 2 à pH = 8.

Dans une publication antérieure, LASSEUR, DOMBRAY, MOREL (1931), ont envisagé ces questions presque exclusivement du point de vue qualitatif. Grâce à des dispositifs nouveaux nous avons (LASSEUR, DUPAIX, GEORGES, 1932) repris l'étude de ces phénomènes au point de vue quantitatif, mais la nécessité d'effectuer presque simultanément la détermination d'une série de paramètres nous a obligés à restreindre le nombre des espèces microbiennes expérimentées.

TECHNIQUE

A) CHOIX DU MATÉRIEL MICROBIEN.

Notre choix s'est limité à une Bactérie: *B. caryocyanus* BEIJERINCK-DUPAIX 1930 (1), et à un Champignon: *Endomyces albicans* VUILLEMIN 1895 (2). Ces deux microorganismes donnent des suspensions relativement

(1) Ce germe a été magistralement étudié par A. DUPAIX, Thèse Pharmacie, Nancy, 1933.

(2) *Oidium albicans* ROBIN 1853, *Monilia albicans* ZOPF 1891.

très homogènes ; les plastides de *B. caryocyaneus* sont, en effet, assez semblables et les cellules d'*Endomyces albicans*, bien que n'étant pas toutes de forme ovoïde, ne présentent pas cependant le polymorphisme très accusé que l'on constate si fréquemment dans les suspensions de Champignons.

B) MILIEUX DE CULTURE.

1° Culture de *B. caryocyaneus*. La culture de *B. caryocyaneus* est effectuée sur gélose-peptone de pH = 7, déterminé électrométriquement (concentration en peptone : 2 %, concentration en gélose : 3 %).

2° Culture d'*Endomyces albicans*. — Si la gélose-peptone convient très bien pour le développement de *B. caryocyaneus*, il n'en est pas de même lorsqu'on s'adresse à *Endomyces albicans*, et pour obtenir une quantité suffisante de corps microbiens, nous avons été conduits à l'emploi de moût gélosé (1). Le moût est additionné de gélose dans la proportion de 3 %. Après dissolution de la gélose à l'autoclave, on porte le liquide à la température de 120° C. pendant trente minutes, on filtre, répartit en boîtes de ROUX et stérilise.

C) ENSEMENCEMENT.

L'ensemencement en boîtes de ROUX exige des précautions spéciales. Il est nécessaire de répandre à la surface de la gelée nutritive environ dix centimètres cubes de suspension de corps microbiens. C'est à cette seule condition que toute la surface de la gélose se recouvre d'une nappe continue de corps microbiens et que ceux-ci peuvent être facilement détachés du substratum nutritif à l'aide d'un faible jet d'eau distillée stérilisée.

D) TEMPÉRATURE DE CULTURE.

Les cultures sont effectuées à la température du Laboratoire.

E) PRÉPARATION DES SUSPENSIONS.

La technique est la même, qu'il s'agisse de *B. caryocyaneus* ou d'*Endomyces albicans*.

(1) Autrefois, le microbiologiste avait à sa disposition du maltose impur qui convenait parfaitement à la culture des Champignons. Le commerce ne fournissant plus ce produit (maltose massé), on peut néanmoins obtenir d'excellents résultats par l'emploi de moûts de brasserie et, à cette occasion, nous tenons à remercier très vivement et très respectueusement M. le Professeur RAUX qui a bien voulu, pendant deux années, tenir à notre disposition des moûts de brasserie.

Nous avons toujours expérimenté sur des corps microbiens âgés de quarante heures.

Les cultures sont recouvertes aseptiquement d'une petite quantité d'eau distillée stérile. Par un mouvement de va-et-vient et de bascule, on émulsionne les germes dans l'eau; on les soumet à trois lavages à l'eau distillée afin de débarrasser les plastides de toutes traces de milieu nutritif. Pour dissocier les colonies élémentaires des corps microbiens ainsi lavés, on les remet en suspension dans une petite quantité d'eau distillée stérile et on les agite avec des billes de verre. La durée d'agitation varie avec les germes considérés, elle est de l'ordre de 15 à 30 minutes.

Une centrifugation fractionnée (durant quelques secondes) sépare ensuite les amas qui auraient pu résister à l'action mécanique.

On obtient donc en définitive, dans le tube à centrifuger, un léger culot de corps microbiens surmonté d'une suspension qu'on décante et qu'on amène, par dilution, à la concentration désirée. On ne saurait attacher trop de soins à la préparation des suspensions. En effet, si l'on veut que les mesures de volume des corps microbiens conservent un sens, il est absolument indispensable d'opérer :

- 1° sur des suspensions formées d'éléments isolés,
- 2° sur un volume de corps microbiens suffisant.

F) PROTOCOLE D'EXPÉRIENCE.

Des séries de tubes A, B, C, etc... reçoivent successivement : la suspension microbienne, la solution colorante, la solution de sulfocyanure de potassium, la solution tampon et l'eau distillée d'après le schéma général ci-dessous :

TABLEAU V
Protocole d'expérience

DÉSIGNA- TION des tubes	SUSPENSION microbienne	SOLUTION colorante	SOLUTION de sulfocyanure de potassium	SOLUTION tampon	EAU distillée
A	3 cm ³	3,6 cm ³	0	0	8,4 cm ³
B	3 cm ³	3,6 cm ³	3 cm ³	0	5,4 cm ³
C	3 cm ³	3,6 cm ³	0	5,4 cm ³	3 cm ³
D	3 cm ³	3,6 cm ³	3 cm ³	5,4 cm ³	0

Après un temps de contact de trente minutes, on détermine le volume des corps microbiens et la quantité de colorant fixée par ces mêmes éléments (1).

G) SOLUTION COLORANTE.

Nous avons utilisé le Bordeaux B (2). Ce colorant, dans l'eau distillée, est extrêmement peu fixé par les Champignons et les Bactéries, comme nous le verrons plus loin. De plus, la solution aqueuse de Bordeaux B possède la propriété, essentielle dans le cas particulier, de ne pas précipiter en présence des électrolytes utilisés.

Le colorant est employé à la concentration de 0,600 gramme de Bordeaux B pour 1000 grammes d'eau distillée.

H) SOLUTION DE SULFOCYANURE DE POTASSIUM.

La solution de sulfocyanure de potassium est faite avec des produits purs du commerce et amenée, après tirage (3), à la concentration 4N/1 (méthode de CHARPENTIER-VOLHARD).

I) SOLUTIONS TAMPONS.

Nous avons employé les solutions tampons de MAC ILVAINE, préparées suivant les indications générales de CLARK (1923).

J) DÉTERMINATION DU *pH* DES SYSTÈMES.

Nous avons mesuré par voie électrométrique (électrode à hydrogène pour les systèmes dépourvus de sulfocyanure de potassium, électrode à quinhydrone pour les systèmes additionnés de sulfocyanure de potassium) le *pH*

(1) Dans des expériences qui seront relatées ultérieurement, le temps de contact a été plus long.

(2) Cet échantillon nous avait été fourni par une firme commerciale sous le nom de Bordeaux R. Etant donnée l'incertitude qui règne toujours sur l'authenticité des matières colorantes, nous avons étudié le spectre d'absorption de la solution aqueuse du produit utilisé. Dans la partie visible du spectre, on observe une large bande d'absorption laquelle, par dilution, donne une bande assez étroite dont le maximum d'absorption de FORMANEK est $\lambda = 520$. D'après FORMANEK, deux Bordeaux R offrent respectivement leur maximum à $\lambda = 529$ et $\lambda = 536$, et un Bordeaux B à $\lambda = 520$. Nous pensons donc devoir identifier notre produit avec le Bordeaux B.

(3) Au laboratoire de M. le Professeur CORDEBARD.

des différents systèmes, car il était à prévoir que le pH des mélanges serait différent de celui des solutions tampons utilisées pour les effectuer. En effet, le mélange *Suspension de B. caryocyanus* + *Solution de sulfocyanure de potassium* + *Solution tampon de $pH = 2,2$* + *Solution colorante*, possède un $pH = 2,65$. Aussi nos courbes ont-elles été établies, non pas en fonction des pH initiaux, mais en fonction des pH finaux.

Volume des corps microbiens.

Le volume des corps microbiens a été déterminé suivant la technique décrite par LASSEUR (1929-1931). Des tubes coniques gradués, en verre résistant, sans épaulement ni courbure, reçoivent 6 cm³ de mélange. On procède à la centrifugation. La durée de la centrifugation varie suivant le germe considéré. La vitesse de sédimentation dépend évidemment de la grosseur et du poids des éléments microbiens. C'est pour cette raison qu'une centrifugation de trois minutes suffit pour obtenir un culot de cellules d'*Endomyces albicans* surmonté d'un liquide rigoureusement limpide alors qu'il faut centrifuger les systèmes contenant *B. caryocyanus* pendant quinze minutes pour atteindre le même résultat. Nous insistons sur le soin qu'il faut apporter à la centrifugation, car si le liquide décanté renferme encore des plastides ou des cellules en suspension, les lectures des volumes et les mesures photolorimétriques n'auront aucun sens.

La multiplicité des systèmes nous oblige généralement à effectuer une série de centrifugations. Malgré les précautions prises : nombre de tours et temps de centrifugation rigoureusement vérifiés, il est des causes d'erreur inhérentes aux variations de courant du secteur. C'est pourquoi nous effectuons les centrifugations d'après le schéma général suivant : soient les systèmes A, B, C, D, E, F, G, H, I, J à centrifuger. Le premier tour comporte les systèmes A, B, C, D, le deuxième tour A, E, F, G, le troisième tour A, H, I, J. Nous attirons l'attention du Lecteur sur l'existence d'un tube témoin dans chaque série.

Fixation du colorant.

Après lecture du volume des corps microbiens à la loupe, on décante avec grand soin le liquide limpide surnageant (1). La quantité de colorant fixée est déterminée indirectement en dosant la fraction de colo-

(1) On décante seulement la partie supérieure du liquide pour être bien sûr de ne pas aspirer de plastides du culot de centrifugation.

rant restée en solution, à l'aide du photolorimètre de TOUSSAINT. Cet appareil de mesure comprend une cellule photoélectrique (cellule au potassium). La teneur du liquide en colorant pourrait être diminuée par fixation du colorant sur les corps microbiens et aussi par précipitation. Mais, comme nous l'avons dit plus haut, le Bordeaux B ne précipite pas dans les systèmes que nous réalisons. Des examens macroscopiques et microscopiques nous ont d'ailleurs montré que l'abaissement de la concentration du liquide en colorant correspond bien à une augmentation de coloration des corps microbiens.

RESULTATS EXPERIMENTAUX.

Nous allons envisager successivement les faits observés avec *B. caryocyanus* et avec *Endomyces albicans*, puis l'interprétation de ces faits.

LES FAITS

Essais effectués avec B. caryocyanus.

Nous résumons dans le tableau ci-dessous quelques-uns des résultats obtenus (1) :

(1) Des raisons de simplification typographique nous obligent: 1° à grouper les résultats obtenus en un tableau général; 2° à représenter sur une même figure la courbe de variation de volume des corps microbiens et la courbe de variation de fixation du colorant par ces mêmes éléments.

Variation de volume des plastides de *B. caryocyanus* en fonction du sulfocyanure de potassium et des ions H ⁺.

Désignation
des tubes

VOLUME DES PLASTIDES

Désignation des tubes	SUSPENSION ADDITIONNÉE DE :									
	EXPÉR. N° 1	EXPÉR. N° 2	EXPÉR. N° 3	EXPÉR. N° 4	EXPÉR. N° 5	EXPÉR. N° 6	EXPÉR. N° 7			
A eau distillée + colorant.....	0,250	—	—	—	—	—	—			
B eau distillée + colorant + KSCN.	0,200	0,175	0,150 (<i>pH</i> = 7,18)	0,100	0,150	—	—			
C eau distillée + colorant + solution tampon de <i>pH</i> = 2,2.....	0,205	0,150	0,115 (<i>pH</i> = 6,34)	0,060-075	0,100	—	—			
D KSCN + colorant + solution tam- pon de <i>pH</i> = 2,2.....	0,205	0,125	0,125 (<i>pH</i> = 2,58)	0,070-075	0,105-110 (<i>pH</i> = 2 52)	—	—			
E eau distillée + colorant + solution tampon de <i>pH</i> = 3.....	0,155	0,100-105	0,090 (<i>pH</i> = 2,65)	0,065	0,090 ? (<i>pH</i> = 2,75)	—	—			
F KSCN + colorant + solution tam- pon de <i>pH</i> = 3.....	—	—	0,100-105 (<i>pH</i> = 3,31)	0,060	0,100 (<i>pH</i> = 3,20)	—	—			
G eau distillée + colorant + solution tampon de <i>pH</i> = 4.....	—	—	0,090 (<i>pH</i> = 3,24)	0,055	0,095 (<i>pH</i> = 3,32)	—	—			
H KSCN + colorant + solution tam- pon de <i>pH</i> = 4.....	—	—	0,105 (<i>pH</i> = 4)	0,075	0,105-110 (<i>pH</i> = 4,23)	—	—			
I eau distillée + colorant + solution tampon de <i>pH</i> = 5.....	—	—	0,095 (<i>pH</i> = 3,90)	0,050-060	0,095 (<i>pH</i> = 4,17)	—	—			
J KSCN + colorant + solution tam- pon de <i>pH</i> = 5.....	—	—	0,150 (<i>pH</i> = 5,23)	0,090	0,130-140 (<i>pH</i> = 5,07)	0,200-205 (<i>pH</i> = 5,01)	0,200			
K eau distillée + colorant + solution tampon de <i>pH</i> = 6,3.....	—	—	0,105 (<i>pH</i> = 4,93)	0,050-055	0,100 (<i>pH</i> = 4,97)	0,175-180 (<i>pH</i> = 4,88)	0,180			
L KSCN + colorant + solution tam- pon de <i>pH</i> = 6,3.....	—	—	0,145 ? (<i>pH</i> = 6,32)	0,050-055	0,130-140 (<i>pH</i> = 6,50)	0,210-220 (<i>pH</i> = 6,24)	0,200			
M eau distillée + colorant + solution tampon de <i>pH</i> = 7.....	—	—	0,135 (<i>pH</i> = 6,25)	0,060-070	0,100-105 (<i>pH</i> = 6,17)	0,200-210 (<i>pH</i> = 6,17)	0,205 ?			
N KSCN + colorant + solution tam- pon de <i>pH</i> = 7.....	—	—	0,150 (<i>pH</i> = 6,98)	0,060-070	—	—	—			
O eau distillée + colorant + solution tampon de <i>pH</i> = 8.....	—	0,155	0,125	—	—	—	—			
P KSCN + colorant + solution tam- pon de <i>pH</i> = 8.....	—	0,145-150	0,120	—	—	—	—			

De l'ensemble du tableau, nous ne voulons retenir que le fait le plus saillant : la contraction des corps microbiens sous l'influence du sulfocyanure de potassium. Le Lecteur qui examinera le tableau d'une façon un peu superficielle pourra être tenté d'attribuer la contraction à une autre cause : la variation de pH des systèmes. Cette hypothèse ne paraît pas vraisemblable : le système A de l'expérience 3 offre un volume de 0,150 pour $pH = 7,18$, tandis que le système K de la même expérience montre un volume du même ordre de grandeur (0,145) bien que le pH soit égal à 6,32. On peut renverser la proposition et montrer que deux systèmes pratiquement de même pH : les systèmes B et K de l'expérience 3 offrent des volumes très différents. En résumé, il semble logique et rationnel d'attribuer les diminutions de volume des systèmes A et B, quelle que soit l'expérience considérée, au sulfocyanure de potassium.

Après avoir écarté les objections que soulève cette première complication, nous allons considérer maintenant la figure 1 où sont représentées les modifications de volume des plastides de *B. caryocyanus* et les variations de fixation du colorant par les mêmes éléments en fonction des ions H^+ et du sulfocyanure de potassium.

1^o Variations de volume des corps microbiens.

Examinons tout d'abord la courbe C, qui représente les variations de volume des plastides en fonction du pH en l'absence de sulfocyanure de potassium. Nous constatons que de $pH = 2,65$ à $pH = 3,6$, le volume des plastides diminue pour atteindre son minimum aux environs de $pH = 3,6$. En 1931, LASSEUR, DUPAIX et OLIVIER avaient observé les minima de volume pour la zone des pH comprise entre $pH = 3,4$ et $pH = 3,6$. Il y a là une concordance tout à fait satisfaisante.

De $pH = 3,6$ à $pH = 5,2$, le volume croît rapidement, pour rester ensuite sensiblement constant jusqu'à $pH = 7$, puis il décroît de $pH = 7$ à $pH = 8$.

L'addition de sulfocyanure de potassium aux différents systèmes modifie de façon notable le volume des corps microbiens, comme le montre la courbe D (fig. 1).

Tout d'abord, le sulfocyanure de potassium détermine une diminution de volume des plastides, quel que soit le pH , exception faite pour le mélange de $pH = 7$. Il y a donc contraction de l'élément bactérien sous l'influence du sulfocyanure de potassium, et nous avons vu que cette diminution de volume est bien due au sulfocyanure de potassium et non à une modification du pH .

B. caryocaneus

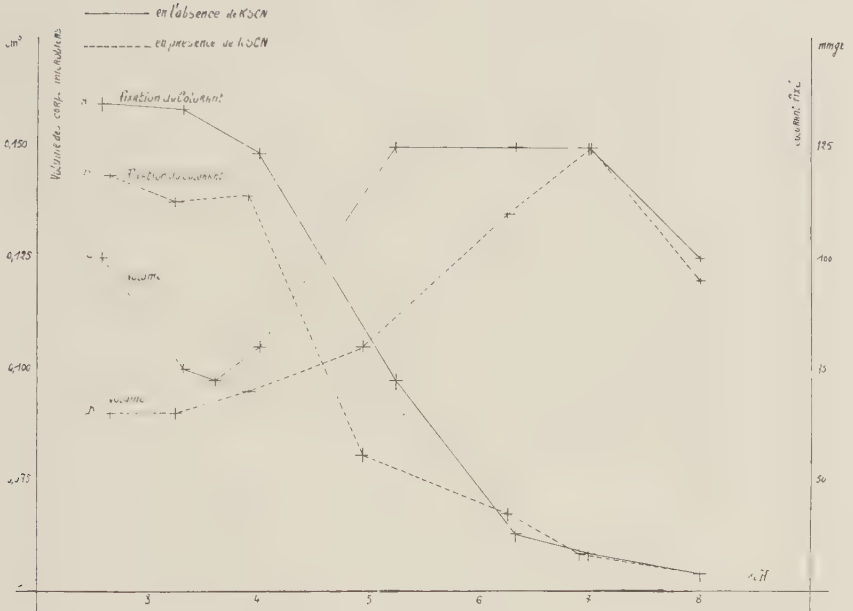


Fig. 1. — *B. caryocaneus*.

- A — Fixation du colorant en fonction du pH en l'absence de sulfocyanure de potassium.
- B — Fixation du colorant en fonction du pH en présence de sulfocyanure de potassium.
- C — Volume des plastides en fonction du pH en l'absence de sulfocyanure de potassium.
- D — Volume des plastides en fonction du pH en présence de sulfocyanure de potassium.

Cette constatation et le fait que la teneur des systèmes en électrolytes croît de $pH = 2,2$ à $pH = 8$ montrent que la variation de volume n'est pas sous l'influence de la concentration en électrolytes, argument qu'invoquerait volontiers un botaniste qui a surtout présentes à la mémoire les premières expériences sur la plasmolyse.

Au point $pH = 7$, le volume des corps microbiens est le même, que les plastides soient en suspension dans l'eau distillée ou dans la solution de sulfocyanure de potassium.

Le volume ne paraît pas varier de $pH = 2,75$ à $pH = 3,30$, il possède alors sa valeur minimum; puis il décroît sans cesse de $pH = 3,30$ à $pH = 7$. Il décroît brusquement de $pH = 7$ à $pH = 8$.

En résumé, nous obtenons deux points singuliers, l'un qui correspond à $pH = 7$, l'autre à $pH = 3,6$. Dans le premier cas, le sulfocyanure de potassium n'influence nullement le volume des corps microbiens, et, dans le deuxième cas, il ne détermine qu'une très faible diminution de ce volume.

2° Variations de fixation du colorant par les corps microbiens.

LASSEUR, DOMBRAY, MOREL (1931) ont montré que la quantité de colorant fixée par *Endomyces albicans* est plus élevée dans les systèmes de pH inférieur que dans les systèmes de pH supérieur au point isoélectrique des protéines. Nous avons repris ces essais en les faisant porter comparativement sur *B. caryocyaneus* et sur *Endomyces albicans*. L'emploi du photolorimètre de TOUSSAINT nous a permis de déterminer de façon précise la quantité de colorant fixée par les corps microbiens. A cet effet, nous avons dosé la fraction de colorant restée en solution dans le liquide décanté après centrifugation des différents systèmes. Les mesures effectuées avec l'appareillage ci-dessus présentent un grave inconvénient, inconvénient inhérent à la forme des cuves. Les cuves étant constituées par des faces mobiles, il est pratiquement impossible d'obtenir des couches liquides ayant rigoureusement la même épaisseur. Pour tourner cette difficulté, nous avons dû, pour chaque expérience, effectuer des mesures, non seulement avec les systèmes étudiés, mais aussi avec les dilutions $C/2$, $C/4$, $C/6$, etc.... $C/256$ de la solution colorante de Bordeaux B (C = concentration de 0,600 gramme de colorant pour mille grammes d'eau distillée). Avec cette deuxième catégorie de mesures, nous avons, chaque fois établi la courbe d'étalonnage qui nous a permis de calculer la quantité de colorant restée en solution dans le liquide examiné. La quantité de colorant mise en œuvre étant connue, il est donc facile de déterminer le nombre de milligrammes de Bordeaux B fixé par les corps microbiens. Les

courbes A et B (fig. 1) représentent les variations de fixation du colorant par les plastides de *B. caryocyanus*, en l'absence de sulfocyanure de potassium (courbe A, fig. 1) et en présence de sulfocyanure de potassium (courbe B, fig. 1).

Examinons la courbe A. De $pH = 2,65$ à $pH = 8$, la quantité de colorant fixée par les corps microbiens décroît incontestablement. Tout d'abord, de $pH = 2,65$ à $pH = 3,3$ la diminution est peu importante, puis, la chute est brusque de $pH = 3,3$ jusqu'à $pH = 6,3$ pour redevenir lente de $pH = 6,3$ à $pH = 8$.

En présence de sulfocyanure de potassium (courbe B) la courbe présente à peu près le même aspect qu'en l'absence de cet électrolyte. Mais, remarquons immédiatement que la courbe B se trouve toujours en dessous de la courbe A, sauf dans la zone des pH allant de $pH = 6,14$ à $pH = 8$. Pour tous les pH compris entre $pH = 2,6$ et $pH = 6,14$, le sulfocyanure de potassium ne favorise donc pas la pénétration du colorant dans la plastide bactérienne. Tels sont, du moins, les faits que nous observons dans nos conditions d'expérience.

ESSAIS EFFECTUÉS AVEC *Endomyces albicans*.

Le tableau VII représente les principaux résultats obtenus avec *Endomyces albicans*.

Désignation
des Tubes

SUSPENSION ADDITIONNÉE DE :

VOLUME DES CELLULES

	EXP. N° 1	EXP. N° 2	EXP. N° 3	EXP. N° 4	EXP. N° 5
A	eau distillée + colorant.....	0,300 ($pH = 5,25$)	0,260	0,245	0,210-220
B	eau distillée + colorant + KSCN....	0,160 ($pH = 5,07$)	0,170	0,150	0,150
C	eau distillée + colorant + solution tampon de $pH = 2,2$	0,300	0,250-255	0,250	0,240
D	KSCN + colorant + solution tampon de $pH = 2,2$	0,175	0,180	0,150-155	0,175
E	eau distillée + colorant + solution tampon de $pH = 3$	0,280 ($pH = 3,02$)	0,245-250	0,250	0,210-220
F	KSCN + colorant + solution tampon de $pH = 3$	0,195 ($pH = 3,44$)	0,170-175	0,150	0,150
G	eau distillée + colorant + solution tampon de $pH = 4$	0,290 ($pH = 3,83$)	0,275-280	0,250	0,250
H	KSCN + colorant + solution tampon de $pH = 4$	0,175 ($pH = 4,05$)	0,175 ?	0,150 ?	0,160-170
I	eau distillée + colorant + solution tampon de $pH = 5$	0,295 ($pH = 4,98$)	0,290	0,260-270	
J	KSCN + colorant + solution tampon de $pH = 5$	0,180-190 ($pH = 4,95$)	0,175	0,145-150	
K	eau distillée + colorant + solution tampon de $pH = 6,3$	0,270 ($pH = 6,32$)	0,250	0,245-250	
L	KSCN + colorant + solution tampon de $pH = 6,3$	0,195 ($pH = 6,12$)	0,160	0,150-155	
M	eau distillée + colorant + solution tampon de $pH = 7$	0,325 ($pH = 6,79$)			
N	KSCN + colorant + solution tampon de $pH = 7$	0,195 ($pH = 6,67$)			
O	eau distillée + colorant + solution tampon de $pH = 8$	0,295 ($pH = 7,97$)			
P	KSCN + colorant + solution tampon de $pH = 8$	0,180			

Pour faciliter la comparaison des résultats, nous avons schématisé l'allure du phénomène dans les courbes E, F, G, H, (fig. 2).

1° *Variations de volume des cellules.*

A) *en l'absence de sulfocyanure de potassium.* — La courbe G représente les variations de volume de cellules d'*Endomyces albicans* en fonction du pH.

Si nous comparons la courbe G (fig. 2) avec la courbe C (fig. 1) (variations de volume des plastides de *B. caryocyanus* en l'absence de sulfocyanure de potassium) nous constatons qu'*Endomyces albicans*, comme *B. caryocyanus*, offre un minimum de volume aux environs de $\text{pH} = 3$. On observe un second minimum de volume à $\text{pH} = 6,3$. A partir de ce point le volume des cellules d'*Endomyces albicans* augmente brusquement et atteint son maximum à $\text{pH} = 6,8$, puis, il décroît rapidement jusqu'à $\text{pH} = 8$.

La courbe de variation de volume observée avec *Endomyces albicans* présente donc un premier minimum voisin de celui que l'on obtient avec *B. caryocyanus*; mais, elle montre en outre un deuxième minimum qui ne s'observe pas avec la Bactérie (1). A partir de $\text{pH} = 7$, les courbes de variation de volume ont la même allure, qu'il s'agisse de l'un ou l'autre des microorganismes expérimentés.

B) *en présence de sulfocyanure de potassium.* — En présence de sulfocyanure de potassium (courbe H, fig. 2) on note une contraction du volume des cellules d'*Endomyces albicans*.

La courbe présente un minimum de volume à $\text{pH} = 3,44$ (valeur très voisine de celle que l'on observe avec *B. caryocyanus*) (courbe D fig. 1) dans les mêmes conditions d'expérience.

Quant au deuxième minimum de volume, il ne se produit pas en présence de sulfocyanure de potassium. De $\text{pH} = 3,44$ à $\text{pH} = 6,9$, le volume croît assez lentement, puis il décroît de $\text{pH} = 6,9$ jusqu'à $\text{pH} = 8$.

Fixation du colorant par les cellules d'Endomyces albicans.

A) *en l'absence de sulfocyanure de potassium.* — La quantité de colorant fixée par les cellules d'*Endomyces albicans* décroît lentement de $\text{pH} = 2,4$ à $\text{pH} = 8$ (courbe E, fig. 2).

(1) LASSEUR, DUPAIX, OLIVIER (1931) ont signalé l'existence de deux minima au cours de l'agglutination de certaines Bactéries.

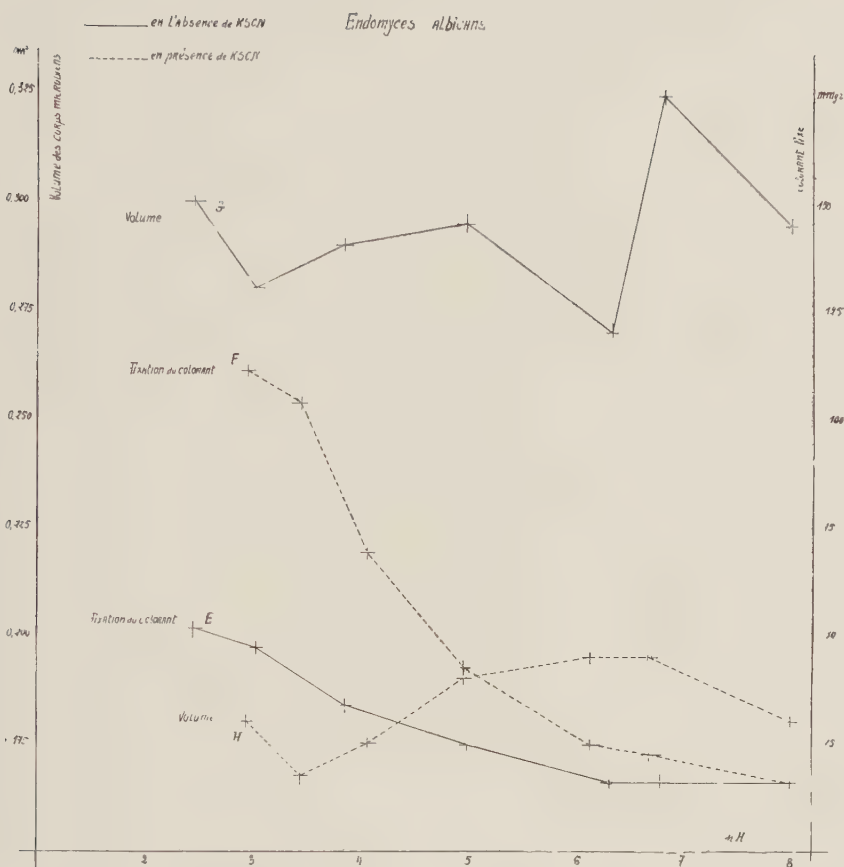


Fig. 2. — *Endomyces albicans*

- E — Fixation du colorant en fonction du pH en l'absence de sulfocyanure de potassium.
- F — Fixation du colorant en fonction du pH en présence de sulfocyanure de potassium.
- G — Volume des cellules en fonction du pH en l'absence de sulfocyanure de potassium.
- H — Volume des cellules en fonction du pH en présence de sulfocyanure de potassium.

B) *en présence de sulfocyanure de potassium*. — Quand on ajoute du sulfocyanure de potassium (courbe F, fig. 2) aux systèmes, la fixation du colorant par les cellules d'*Endomyces albicans* est favorisée quel que soit le pH considéré, contrairement à ce que l'on observe avec *B. caryocyaneus*. La perméabilité de la membrane augmente considérablement pour la zone des pH allant de $\text{pH} = 2,9$ à $\text{pH} = 5$.

En résumé, si nous comparons les résultats obtenus avec la Bactérie et avec le Champignon, nous constatons que :

1° Les deux microorganismes : *B. caryocyaneus* et *Endomyces albicans*, présentent toujours un minimum de volume entre $\text{pH} = 3,3$ et $\text{pH} = 3,6$, que les systèmes soient ou ne soient pas additionnés de sulfocyanure de potassium.

2° La courbe de variation des volumes de *B. caryocyaneus* présente un point singulier à $\text{pH} = 7$. Pour cette valeur de pH, le volume des corps microbiens est le même en présence et en l'absence de l'ion SCN^- .

3° Les cellules d'*Endomyces albicans* offrent un second minimum de volume pour un $\text{pH} = 6,3$, dans les mélanges dépourvus de sulfocyanure de potassium ; l'addition de cet électrolyte fait disparaître le second minimum.

4° L'ion SCN^- contracte le volume des cellules d'*Endomyces albicans* (de $\text{pH} = 2,2$ à $\text{pH} = 8$) et des plastides de *B. caryocyaneus* (de $\text{pH} = 2,2$ à $\text{pH} = 7$). La diminution de volume est beaucoup plus intense pour le Champignon que pour la Bactérie.

5° La quantité de colorant fixée par *B. caryocyaneus* et par *Endomyces albicans* décroît sans cesse de $\text{pH} = 2,2$ à $\text{pH} = 8$, que l'on ait ou non ajouté du sulfocyanure de potassium aux mélanges.

6° En présence de l'ion SCN^- , avec *B. caryocyaneus*, la perméabilité de la membrane au colorant est diminuée de $\text{pH} = 2,6$ à $\text{pH} = 6,3$.

7° Pour le Champignon, au contraire, la quantité de colorant fixée est plus grande en présence de sulfocyanure de potassium qu'en l'absence de cet électrolyte.

INTERPRÉTATION DES FAITS

La fixation du colorant par les cellules d'*Endomyces albicans* en fonction du sulfocyanure de potassium est conforme à la théorie de BOAS, puisque nous fixons une plus grande quantité de colorant en présence de sulfocyanure de potassium qu'en l'absence de cet électrolyte. Dans ce cas particulier

nous pouvons donc admettre avec BOAS que l'ion SCN^- a augmenté la perméabilité de la membrane pour le colorant expérimenté. On sait que d'après BOAS l'ion SCN^- possède « *une puissante action de surface* », par suite, il est énergiquement adsorbé, il précipite le réseau protecteur de lipides des plastides ou des cellules (1). A partir de ce moment, l'adsorption est favorisée.

En exposant ainsi l'hypothèse de BOAS nous la mutilons, car l'éminent biologiste place à la base de sa théorie le phénomène de gonflement et c'est sur ce point que l'ensemble de nos résultats est en contradiction apparente avec l'hypothèse proposée par le savant allemand. En effet, dans nos conditions d'expérience, nous n'avons jamais observé le gonflement des cellules ou plastides sous l'influence du sulfocyanure. Nous avons toujours noté, au contraire, une contraction du volume des corps microbiens.

Quant à l'augmentation de la perméabilité de la membrane pour le colorant expérimenté par l'ion SCN^- , nous ne l'avons pas constatée pour *B. caryocyaneus* dans la zone des pH allant de pH 2,2 à pH = 6,3.

(1) Pour BOAS et l'Ecole allemande, il existe dans tout élément vivant un système lipoïdique qui règle l'adsorption.

CHAPITRE III

Influence de la composition de la solution tampon

Généralités

Un ensemble de faits observés par G. BERTRAND et ses Collaborateurs, KOPACZEWSKI ; LASSEUR, DUPAIX, OLIVIER (1931), LASSEUR, DUPAIX, GROJEAN (1932), LASSEUR, DUPAIX, GEORGES (1932), montrent que la concentration en ions H^+ n'est pas le seul facteur qui intervienne dans certains processus biologiques. C'est la raison pour laquelle j'ai cherché si les variations de volume des plastides de *B. caryocyaneus* et des cellules d'*Endomyces albicans* et la fixation d'un colorant par ces microorganismes n'étaient pas influencées par la nature du radical auquel l'hydrogène est attaché dans la molécule acide.

En 1909, G. BERTRAND et M. ROZENBAND au cours de leurs recherches relatives à l'action paralysante exercée par certains acides sur la peroxydiastase déclarèrent que « *la peroxydiastase ou, du moins, le système diastasique qui lui correspond est influencé à la fois par la fonction acide et, dans une très forte mesure, par le radical auquel cette fonction se trouve attachée* » (p. 320). Puis le célèbre savant français généralise en écrivant : « *dans le cas de la peroxydiastase, de la sucrase et, sans doute, de beaucoup d'autres ferments solubles... l'activité des acides ne dépend pas seulement des ions hydrogène qui proviennent de leur dissociation électrolytique, mais encore dans une large proportion, de la nature des radicaux ou anions auxquels cet hydrogène est attaché dans la molécule acide* » (p. 331).

KOPACZEWSKI, poursuivant des recherches sur les processus fermentatifs, conclut ainsi : « *...il n'y a pas seulement la concentration en ions H^+ qui agit, mais aussi la nature des anions auxquels sont liés les acides* » (p. 193, 1912). Et, après avoir examiné l'influence des acides sur l'activité de la maltase dialysée, l'auteur admet que « *dans les réactions catalytiques par les acides, ce n'est pas la partie dissociée qui possède l'influence capitale... la partie non dissociée joue un rôle très important* » (p. 163, 1915).

L'influence de l'anion avait été nettement remarquée par J. LOEB et R.-F. LOEB (1921-1922). Ces savants ont constaté qu'il y avait gonflement de la caséine en présence d'HCl et de NO₃H, ce phénomène ne s'observant jamais avec l'acide trichloracétique. J. LOEB considère ces effets de l'anion comme tout à fait secondaires et veut tout ramener à l'action de l'ion H⁺.

BOAS (1927), FISCHER (1928), WEISER (1928) arrivent à des conclusions analogues à celles de G. BERTRAND et de KOPACZEWSKI.

LASSEUR et ses Collaborateurs (1931) ont constaté une action de la composition de la solution tampon sur le volume des plastides, le volume du complexe *anticorps-antigène* et l'agglutination sérique des Bactéries.

Dans les expériences que nous allons résumer nous avons essayé de mettre en évidence l'influence du radical (anion) : 1) sur le volume des plastides de *B. caryocyanus*; 2) sur la fixation du colorant par ces mêmes éléments.

Recherches personnelles

: TECHNIQUE

L'ensemencement, la culture, la mise en suspension des germes ont été décrits page 42, nous n'y reviendrons donc pas.

Nous rappelons seulement le protocole d'expérience.

TABLEAU VIII

Protocole d'expérience.

DÉSIGNATION des tubes	SUSPENSION microbienne	SOLUTION colorante	SOLUTION de sulfocyanure de potassium	SOLUTION tampon	EAU distillée
—	—	—	—	—	—
A	3 cm ³	3,6 cm ³	0	0	8,4 cm ³
B	3 cm ³	3,6 cm ³	3 cm ³	0	5,4 cm ³
C	3 cm ³	3,6 cm ³	0	5,4 cm ³	3 cm ³
D	3 cm ³	3,6 cm ³	3 cm ³	5,4 cm ³	0

La détermination des paramètres est effectuée après un temps de contact de trente minutes.

SOLUTION COLORANTE.

La solution colorante contient 0 gr. 600 de Bordeaux B pour mille grammes d'eau distillée.

SOLUTION DE SULFOCYANURE DE POTASSIUM.

Comme dans les essais précédents, nous avons utilisé une solution de sulfocyanure de potassium 4N/1.

SOLUTIONS TAMPONS.

Ces expériences comportant l'emploi d'un certain nombre de systèmes témoins, nous avons dû limiter nos essais à deux zones de pH : $\text{pH} = 2,2$ et $\text{pH} = 8$.

Pour chaque pH, nous avons réalisé trois solutions tampons, de composition différente, préparées suivant les indications générales de CLARK.

Nous indiquons sous une forme schématique la composition de chacune des solutions tampons que nous désignerons conventionnellement sous le nom de : solutions A, B, C, D, E, F.

I) SOLUTIONS TAMPONS DE $\text{pH} = 2,2$.

1° *Solution A.* — (CLARK, 1923), 50 cm³ solution KCl à 14 gr. 912 0/00 + 6,7 cm³ solution HCl N/5 + eau distillée q. s. p. 200 cm³.

2° *Solution B.* — (MAC ILVAINE, 1921), 4 cm³ solution phosphate acide de sodium ($\text{PO}_4\text{Na}_2\text{H}$) à 35 gr. 60 0/00 + 196 cm³ solution acide citrique à 21 gr. 0/00.

3° *Solution C.* — (CLARK et LUBS, 1916) 50 cm³ solution phthalate acide de potassium à 40 gr. 828 0/00 + 46 cm³ 7 solution HCl N/5 + eau distillée q. s. p. 200 cm³.

II) SOLUTIONS TAMPONS DE $\text{pH} = 8$.

1° *Solution D.* — (CLARK et LUBS, 1916) 50 cm³ solution phosphate acide de potassium ($\text{PO}_4\text{K}_2\text{H}$) à 27 gr. 232 0/00 + 46 cm³ 80 solution NaOH N/5 + eau distillée q. s. p. 200 cm³.

2° *Solution E.* — (MAC ILVAINE, 1921) 194 cm³ 5 solution phosphate acide de sodium ($\text{PO}_4\text{Na}_2\text{H}$) à 35 gr. 10 0/00 + 5 cm³ 5 solution acide citrique à 21 gr. 0/00.

3° *Solution F.* — (CLARK et LUBS, 1916) 50 cm³ solution acide borique 12 gr. 4048 0/00 + 50 cm³ solution KCl à 14,912 0/00 + 3 cm³ 97 solution NaOH N/5 + eau distillée q. s. p. 200 cm³.

MESURE DES PARAMÈTRES

Pour tout ce qui concerne la mesure des paramètres, le Lecteur voudra bien se reporter à la page 45 où elle a été exposée en détail :

On ne peut rechercher l'influence de la nature du radical attaché à l'hydrogène dans la molécule acide qu'à la condition « *sine qua non* » de ne comparer entre elles que des solutions de même pH (grandeur que l'on aura déterminée expérimentalement par voie électrométrique) car on n'est jamais sûr de la pureté des produits que l'on utilise. De même, pour des essais de ce genre, les déterminations de pH doivent être répétées afin d'éviter des erreurs systématiques.

RESULTATS EXPERIMENTAUX

Nous avons étudié l'influence de la composition des solutions tampons sur les plastides de *B. caryocyaneus*. Nous résumons dans le tableau ci-dessous quelques-uns des résultats obtenus au cours de cette expérimentation.

TABLEAU IX

Variation de volume des plastides de *B. caryocyaneus*,
variation de fixation du Bordeaux B, en fonction de la composition
de la solution tampon.

DÉSIGNATION des systèmes	pH des solu- tions tam- pons	SOLUTION TAMPON	VOLUME DES PLASTIDES		QUANTITÉ DE COLORANT FIXÉE exprimée en milligr. par litre	
			en l'absence de KSCN	en présence de KSCN	en l'abs. de KSCN	en prés. de KSCN
1	2,2	A	0,150 (0,240) (1)	0,150 (0,240)	42,5	51,5
2	2,2	B	0,125 (0,200)	0,100-105 (0,150-160)	132,2	112,5
3	2,2	C	0,125 (0,200)	0,100 (0,160)	132,2	112,5
4	8	D	0,150-155	0,150		16
5	8	E	0,155	0,145-150	2,5	38
6	8	F	0,175	0,145	2,5	38
Témoin : eau distillée			0,175 (0,250)	0,150 (0,200)	2,5	20,5

(1) Les nombres entre parenthèses indiquent des résultats obtenus au cours d'autres expériences.

Nous allons tout d'abord examiner l'influence des solutions tampons de $\text{pH} = 2,2$ sur le volume des plastides de *B. caryocyaneus*, puis la fixation du Bordeaux B par ces mêmes éléments.

1° SOLUTIONS TAMPONS DE $\text{pH} = 2,2$.

A) *Action sur le volume des plastides de B. caryocyaneus.*

I. *en l'absence de sulfocyanure de potassium.* — Toutes les solutions tampons déterminent une contraction du volume des plastides bactériennes comparativement au volume qu'elles occupent dans l'eau distillée. Cette diminution de volume varie avec la solution tampon considérée : c'est ainsi que la contraction est plus faible avec la solution A qu'avec les solutions B et C.

II) *en présence de sulfocyanure de potassium.* — Voyons maintenant si l'addition de sulfocyanure de potassium modifie les conclusions ci-dessus. Nous constatons que le sulfocyanure de potassium est sans action lorsqu'on le fait agir en présence de solution tampon A. Il n'en est pas de même lorsqu'on s'adresse aux solutions tampons B et C. Là encore, les solutions tampons B et C se comportent de la même façon, mais elles restent fondamentalement différentes de la solution tampon A.

La présence de sulfocyanure de potassium dans un système auquel on n'ajoute pas de solution tampon suffit à elle seule pour déterminer une diminution de volume des corps microbiens comparativement au volume obtenu dans l'eau distillée. La contraction provoquée par le sulfocyanure de potassium paraît s'ajouter à celle qui est déterminée par les ions H^+ quand on considère les solutions tampons B et C.

B) *Action sur la fixation du Bordeaux B par les plastides de B. caryocyaneus.*

I. *en l'absence de sulfocyanure de potassium.* — L'examen du tableau IX permet encore de différencier nettement la solution tampon A des solutions tampons B et C. Remarquons tout d'abord que, dans l'eau distillée, le Bordeaux B est extrêmement peu fixé par les plastides bactériennes. Comme dans les expériences précédentes, les solutions tampons de $\text{pH} = 2,2$ favorisent la fixation du colorant par les plastides de *B. caryocyaneus*, mais l'augmentation de la quantité de colorant fixée est fonction du type de solution tampon utilisée. La perméabilité de la membrane pour le colorant est exaltée quand on s'adresse aux solutions tampons B et C. La quantité

de colorant fixée est trois fois plus forte dans les systèmes 2 et 3 que dans le système 1.

II. *en présence de sulfocyanure de potassium.* — Nous retrouvons une action semblable des deux solutions tampons B et C.

Alors que dans le système 1 la perméabilité de la membrane pour le colorant est légèrement augmentée, dans les systèmes 2 et 3 nous assistons à une diminution de cette perméabilité. Ce fait n'a rien qui puisse nous surprendre, nous avons constaté dans l'étude de la variation de fixation du colorant par *B. caryocyaneus* en fonction des ions H^+ que l'addition de sulfocyanure de potassium, loin de favoriser la pénétration du Bordeaux B, diminuait, au contraire, la quantité de colorant fixée par *B. caryocyaneus*.

Donc, dans les systèmes renfermant du sulfocyanure de potassium, nous retrouvons les mêmes différences fondamentales entre la solution tampon A d'une part et les solutions tampons B et C d'autre part.

2° SOLUTIONS TAMPONS DE $pH = 8$.

Avec les solutions tampons de $pH = 2,2$ nous avons observé une action nette de la nature de la solution tampon. L'influence de l'anion ne s'est pas manifestée d'une façon très sensible avec les solutions tampons de $pH = 8$ que nous avons utilisées. Je crois cependant utile de signaler des résultats obtenus.

A) *Action sur le volume des plastides de B. caryocyaneus.*

I. *en l'absence de sulfocyanure de potassium.* — Comparativement au volume observé dans l'eau distillée, les solutions tampons D et E contractent le volume des corps microbiens, alors que la solution F se montre sans action.

II. *en présence de sulfocyanure de potassium.* — Les solutions tampons D, E ou F ne se différencient pas les unes des autres en présence du sulfocyanure de potassium.

B) *Action sur la fixation du Bordeaux B par les plastides de B. caryocyaneus.*

I. *en l'absence de sulfocyanure de potassium.* — Les trois solutions tampons de $pH = 8$ se comportent de la même façon. Tout se passe comme si le milieu dispersif était l'eau distillée.

II. *en présence de sulfocyanure de potassium.* — Les solutions tampons E et F permettent la pénétration d'une quantité de Bordeaux B double de celle qui est fixée en présence de la solution D..

CONCLUSIONS

Pour synthétiser l'influence de la nature de la solution tampon sur les phénomènes observés, nous envisagerons tout d'abord les résultats obtenus avec les solutions tampons de $\text{pH} = 8$. Nous étudierons ensuite l'action des solutions tampons de $\text{pH} = 2,2$ où l'influence de la nature de la solution tampon est incontestable.

Dans les systèmes dépourvus de sulfocyanure de potassium la solution F se différencie des solutions D et E quant au volume des corps microbiens.

Par contre, la solution D ne se comporte pas comme les solutions E et F dans la fixation du colorant en présence de l'ion SCN^- .

En l'absence de sulfocyanure de potassium, les solutions B et C (de $\text{pH} = 2,2$) déterminent sensiblement la même contraction de volume des corps microbiens de *B. caryocyaneus*. La solution A provoque une diminution de volume plus faible que celle qui est réalisée par les solutions B et C.

On observe des faits à peu près analogues dans les systèmes additionnés de sulfocyanure de potassium.

Dans la fixation du colorant on retrouve cette même différenciation des solutions B et C d'une part, et de la solution A d'autre part.

On ne saurait donc contester l'influence de la nature de la solution tampon sur les phénomènes que nous venons d'étudier.



CHAPITRE IV.

Influence de la concentration en ions OH— sur l'opacité de quelques suspensions microbiennes

Généralités

LASSEUR et DUPAIX (1931) ont étudié les modifications d'opacité des suspensions de *B. caryocyaneus* et de *B. chlororaphis* pour des pH de l'ordre de pH = 3 à pH = 12. Dans ces essais, le trouble des suspensions bactériennes diminue notablement de pH = 3 à pH = 12. A pH = 12, l'éclaircissement est pratiquement instantané.

B. caryocyaneus et *B. chlororaphis* appartiennent au groupe des Bactéries « *ne prenant pas le GRAM* », c'est-à-dire qu'elles se décolorent rapidement par la méthode de GRAM.

Les faits observés par LASSEUR et DUPAIX sont-ils d'ordre général ou doivent-ils être limités à ce groupe de Bactéries « *ne prenant pas le GRAM* » ? C'est ce point que nous allons envisager tout d'abord en rappelant comme l'ont fait LASSEUR et SCHMITT (1927) que la division en Bactéries « *prenant le GRAM* » et Bactéries « *ne prenant pas le GRAM* » est tout à fait arbitraire et qu'elle n'a de sens que pour des temps très courts. En effet, toutes les Bactéries se décolorent par la méthode de GRAM, mais la vitesse de décoloration varie. Avec certains germes la décoloration est totale en quelques secondes, avec d'autres, il faut des temps d'action du décolorant de l'ordre d'heures.

Plusieurs théories ont été proposées pour expliquer le mécanisme de la réaction de GRAM. Certains auteurs, s'inspirant de la théorie d'OVERTON, attribuent à la présence ou à l'absence de matières grasses, de lipoprotéides et de nucléoprotéides les différences de vitesse de décoloration dans la méthode de GRAM. C'est l'avis de CEDERCREUTZ, DEUSSIN, GUERBET, MEYER, SCHUMACKER, SCHOEFFER, SCHMIDT.

Pour FISCHER, le fait de « *prendre* » ou de « *ne pas prendre* » le GRAM ne doit pas être imputé à des substances spéciales, mais à des va-

riations de perméabilité des plastides. Ce savant divise les Bactéries en deux groupes :

1° Les germes non plasmolysables, donc perméables. Ce groupe renferme presque exclusivement des Bactéries « *prenant le GRAM* ».

2° Les germes plasmolysables, donc imperméables. Dans cette catégorie, on rencontre surtout des Bactéries « *ne prenant pas le GRAM* ».

BRUDNY (1908), EISENBERG (1910) partagent l'opinion de FISCHER.

C'est aussi à des variations de perméabilité que BOAS ramène le mécanisme de la réaction de GRAM lorsqu'il fait intervenir « *la différence marquée dans la sensibilité envers les sels, les matières colorantes, les forts poisons cellulaires, etc...* » Il déclare qu'il peut « *exister tout au plus une imperméabilité relative.. une expression comme imperméabilité ne peut produire que confusion.* »

Si EISENBERG a constaté dans certains cas des différences de résistance aux électrolytes entre les Bactéries « *prenant le GRAM* » et les Bactéries « *ne prenant pas le GRAM* », dans d'autres cas il reconnaît que les Bactéries de ces deux groupes se comportent de la même façon vis-à-vis de quelques sels.

Des recherches récentes ont établi que la déplasmolyse succède à la plasmolyse et c'est là un fait d'ordre général.

Il s'ensuit que la classification proposée par FISCHER n'est pas susceptible de généralisation. Elle n'est valable que pour des conditions d'expérience bien déterminées.

Toutes ces interprétations s'appuient sur des modifications de croissance, des arrêts de végétation, des altérations pouvant déterminer la mort de la plastide etc... LASSEUR et ses Collaborateurs (1931-1932) ont envisagé la question du point de vue de l'hydratation des plastides, cette hydratation pouvant déterminer secondairement la diminution du trouble des suspensions bactériennes.

Les travaux précédents laissent entrevoir des différences de composition, de structure entre les deux grands groupes de Bactéries établis par les Bactériologistes. Si la chose est exacte, on devra observer des variations dans les processus d'hydratation et c'est pour cela qu'il nous a semblé intéressant d'étudier des Bactéries « *prenant le GRAM* » et des Bactéries « *ne prenant pas le GRAM* ». On pouvait prévoir que les premières seraient moins sensibles aux ions OH— que les secondes.

Si la nature du Bactériophage donne encore lieu à de nombreuses discussions, la lyse des Bactéries sous l'influence d'un agent filtrable est un fait admis par tous. Or nous savons que, dans une même espèce bacté-

rienne, il est possible de trouver des souches, des races qui sont, les unes résistantes et les autres extrêmement sensibles à l'action du Bactériophage homologue. Cette façon différente de se comporter vis-à-vis du Bactériophage implique nécessairement des variations sinon de composition chimique, du moins de l'état physico-chimique dans les diverses souches ou races d'une même espèce bactérienne. Par suite, on est autorisé non seulement à étudier comparativement l'action des ions OH^- sur des Bactéries « prenant le GRAM » et sur des Bactéries « ne prenant pas le GRAM » mais encore à expérimenter sur les types sensibles et non sensibles au Bactériophage. Ces derniers essais nous ont été possibles grâce à l'amabilité de M. le Professeur HAUDUROY qui, à la suite de sa magistrale conférence (1) sur le Bactériophage de d'HERELLE, a bien voulu faire parvenir au Laboratoire des souches lysables et non lysables de Staphylocoque et de Colibacille.

Les ions OH^- permettraient donc d'établir des distinctions très nettes entre les diverses Bactéries. Par suite, on est autorisé à prévoir des différences encore plus marquées dans le comportement des Bactéries et des Champignons vis-à-vis des ions OH^- . C'est la raison pour laquelle nous avons étudié comparativement en collaboration avec Ph. LASSEUR et A. DUPAIX les variations de l'opacité des suspensions de Bactéries et de Champignons en fonction des ions OH^- .

Recherches personnelles

TECHNIQUE

CHOIX DU MATÉRIEL BACTÉRIEN.

Parmi les Bactéries « prenant le GRAM », nous avons utilisé des germes du groupe *B. mesentericus*, *B. megatherium*, *B. subtilis*, et parmi les *Cocci* « prenant le GRAM », le Staphylocoque lysable (souche HAUDUROY) et non lysable (souche I. P.) (2).

En ce qui concerne les germes « ne prenant pas le GRAM » nous avons expérimenté sur trois souches de Colibacille non lysables [*B. coli communis* (souche selles, I. P.); *B. coli communis* (souche F, I. P.); *B. coli communis* (souche L, I. P.)] une souche de Colibacille lysable (souche HAUDUROY), *B. caryocyanus* BEIJERINCK-DUPAIX, *B. proteus* (souche I. P.) et *B. pyocyanus pyocyanogenes*.

Ces Bactéries par agitation avec des billes de verre donnent assez facilement des suspensions homogènes.

Les Champignons qui poussent en longs filaments ne se prêtent guère à l'obtention de telles suspensions; aussi avons-nous arrêté notre choix sur

(1) Faite au Laboratoire de Microbiologie, novembre 1931.

(2) I. P. est une abréviation de : Institut PASTEUR, Paris.

diverses espèces d'*Endomyces*: *Endomyces albicans* VUILLEMIN 1895, *Endomyces Chodati* ZENDER 1925, *Endomyces javanensis* KLÖCKER 1909, *Endomyces Magnusii* LUDWIG 1886, *Endomyces Margaritae* ZENDER 1928 et *Endomyces Trumpyi* ZENDER 1928. Les cellules de ces microorganismes présentent en général une forme ovoïde et leurs colonies élémentaires sont facilement dissociables.

MILIEUX DE CULTURE. ENSEMENCEMENT. PRÉPARATION DES SUSPENSIONS

Les Bactéries et les Champignons sont cultivés respectivement sur gélose-peptone de pH = 7 et sur moût gélosé de pH = 5,5, soit à la température du Laboratoire, soit à la température de 37° C., suivant les exigences des germes.

Les cultures âgées de quarante heures sont recouvertes d'eau distillée stérile, puis, les corps microbiens ainsi mis en suspension sont soumis à trois lavages dans le même liquide dispersif. Après agitation avec des billes de verre et centrifugation fractionnée, la suspension obtenue est amenée, par dilution, à une concentration convenable (quatre milliards de germes par centimètre cube). Le Lecteur voudra bien se reporter à la page 42 du présent travail pour tous les détails relatifs à ces opérations.

PROTOCOLE D'EXPÉRIENCE

On réalise l'expérience d'après le protocole général suivant :

DÉSIGNATION des tubes	SUSPENSION microbienne	EAU DISTILLÉE	SOLUTION TAMPON de pH = 12
A	10 cm ³	10 cm ³	0
B	10 cm ³	0	10 cm ³

Après un temps de contact de trente minutes, les systèmes sont examinés au photomètre graduel de ZEISS.

SOLUTION TAMPON DE pH = 12.

La solution tampon a été préparée suivant la formule de RINGER :

50 cm³ de solution de PO₄Na₂H à 26 gr. 70 o/oo + 75 cm³ de solution de NaOH N/10.

Malgré la pureté des produits utilisés, nous avons procédé à la détermination électrométrique du pH.

MESURE DE L'ADSORPTION.

Les mesures ont été faites à l'aide du photomètre graduel de ZEISS. L'éclairage est réalisé par la lampe STUPHO. On examine les suspensions

sous une épaisseur de vingt millimètres. L'étalon clair (eau distillée optiquement vide) est placé à droite, on tourne le tambour de mesure à droite en diminuant l'ouverture du diaphragme. Le nombre lu sur le tambour indique immédiatement l'intensité de la lumière transmise par la suspension en pour cent de l'intensité de la lumière incidente, c'est-à-dire la transparence en pour cent. La différence entre 100 et ce nombre mesure l'absorption en pour cent.

Afin d'éliminer ou du moins de réduire le facteur personnel, toutes les mesures ont été faites par trois opérateurs.

RESULTATS EXPERIMENTAUX

LES FAITS.

Dans les tableaux ci-dessous, nous indiquons quelques-unes des valeurs observées au cours de ces expériences.

TABLEAU X

Variation de l'absorption des suspensions bactériennes
sous l'influence des ions OH—.

DÉSIGNATION DES ESPÈCES MICROBIENNES	ABSORPTION (%) DES SUSPENSIONS MICROBIENNES			
	1 ^{re} Série		2 ^e Série	
	SUSPEN- SION + eau distillée	SUSPEN- SION + solut. tampon	SUSPEN- SION + eau distillée	SUSPEN- SION + solut. tampon
<i>B. megatherium</i> (FICKER, Berlin) (1)	82	80	96	96
<i>B. mesentericus niger</i> (BEIJERINCK).	85	83	95	94
<i>B. subtilis</i> (KASSEL, Heidelberg)....	76	73	97	96,75
<i>Staphylococcus aureus</i> (I. P.).....	90	90	84	84
Staphylocoque lysable (souche HAU- DUROY)	92	89,5	76	69
<i>B. caryocyanus</i> BEIJERINCK-DUPAIX	92	32	92,5	41
<i>B. coli communis</i> (souche selles, I. P.)	83	70	80	55
<i>B. coli communis</i> (souche F, I. P.)...	81	64	95	89,5
<i>B. coli communis</i> (souche L, I. P.)...	91,5	71	79	50
Colibacille lysable (souche HAUDU- ROY)	92	81	85	60
<i>B. proteus</i> J. M. (I. P.).....	74	41	95,5	85
<i>B. pyocyaneus</i> var. <i>pyocyanogenes</i> (P. e P.).....	84	45		

(1) Les noms entre parenthèses indiquent l'origine des souches utilisées.

TABLEAU XI

Variation de l'absorption des suspensions de Champignons
sous l'influence des ions OH—.

DÉSIGNATION des espèces microbiennes	ABSORPTION (%) DES SUSPENSIONS MICROBIENNES	
	suspension + eau distillée	suspension + solution tampon
<i>Endomyces albicans</i>	89	89
<i>Endomyces Chodati</i>	80	77
<i>Endomyces javanensis</i>	93	89
<i>Endomyces Magnusii</i>	80	80
<i>Endomyces Margaritæ</i>	91	90
<i>Endomyces Trumpyi</i>	80	78

Nous allons tout d'abord envisager l'action des ions OH— sur les suspensions de Champignons.

Le tableau XI montre que, dans nos conditions d'expérience, les Champignons sont peu ou pas sensibles à l'influence des ions OH—. Seules les suspensions d'*Endomyces Chodati*, *Endomyces javanensis* et *Endomyces Trumpyi* voient leur trouble diminuer très légèrement par addition de solution tampon de pH = 12. Une influence aussi petite n'est d'ailleurs pas perceptible à l'œil nu.

En ce qui concerne les Bactéries, on peut distinguer deux catégories de germes :

1° Les Bactéries peu ou pas sensibles à l'action des ions OH—, tel est le cas de *B. mesentericus*, *B. megatherium*, *B. subtilis*, *Staphylococcus aureus*.

2° Les Bactéries sensibles à l'action des ions OH—, ce sont: *B. caryocyaneus*, *B. coli communis*, *B. proteus*, *B. pyocyaneus*, Staphylocoque lysable et Colibacille lysable.

Certaines suspensions offrent un éclaircissement instantané des suspensions (*B. caryocyaneus*, *B. pyocyaneus*).

INTERPRÉTATION DES FAITS.

Les deux catégories de Bactéries que nous venons d'établir correspondent: la première, aux Bactéries « prenant le GRAM », la seconde, aux Bactéries « ne prenant pas le GRAM ».

Le tableau X peut être examiné au point de vue du parallélisme qui pourrait exister entre la résistance des Bactéries aux ions OH^- et leur résistance au décolorant dans la méthode de GRAM. Nous constatons tout d'abord que les Bactéries dites « *prenant le GRAM* », c'est-à-dire dont la vitesse de décoloration est très grande, sont très peu influencées par les ions OH^- . *B. caryocyaneus*, *B. proteus*, *B. pyocyaneus* qui sont décolorés très rapidement par la méthode de GRAM subissent rapidement et profondément l'action des ions OH^- . Il semblerait donc qu'il existe un parallélisme entre la résistance des Bactéries aux ions OH^- et leur résistance au décolorant. Malheureusement les différentes souches de Colibacille, bien que se décolorant rapidement par la méthode de GRAM offrent une résistance variable, il est vrai, mais toujours élevée aux ions OH^- .

Cette exception ne doit pas nous faire abandonner l'idée d'un parallélisme, mais seulement nous inciter à effectuer des recherches sur un plus grand nombre d'espèces bactériennes afin de vérifier le bien fondé de notre hypothèse.

Ce qui semble donner quelque créance à cette supposition c'est que les Champignons qui, on le sait, restent colorés par la méthode de GRAM, sont résistants et relativement très résistants, à l'action des ions OH^- .

L'hypothèse émise au début de ce chapitre, à savoir la résistance différente des Bactéries aux ions OH^- suivant leur vitesse de décoloration dans la méthode de GRAM, se trouve donc vérifiée expérimentalement.

Etudions maintenant comparativement l'action des ions OH^- sur les germes lysables et non lysables d'une même espèce bactérienne.

Les suspensions de *Staphylococcus aureus* transmettent la même quantité de lumière, que le milieu dispersif soit l'eau distillée ou la solution tampon de $\text{pH} = 12$.

Il n'en est pas de même pour le Staphylocoque lysable (souche HAUDUROY), on observe une diminution incontestable du trouble des suspensions de Staphylocoque lysable par addition de solution tampon de $\text{pH} = 12$. Dans ce cas on est donc autorisé à établir un parallélisme entre l'aptitude de ce germe à la lyse par le Bactériophage homologue et sa sensibilité aux ions OH^- .

Malheureusement, ces conclusions ne peuvent pas être étendues au Colibacille. L'addition de solution tampon de $\text{pH} = 12$ ne modifie pas plus le trouble des suspensions de Colibacille lysable que celui des suspensions de Colibacille non lysable.

En résumé, dans ces conditions d'expérience, les Champignons et les Bactéries « *prenant le GRAM* » résistent à l'action des ions OH^- . Il

n'en est pas de même pour les Bactéries qui se décolorent rapidement par la méthode de GRAM. Dans ce groupe l'action des ions OH^- pourrait être utilisée comme caractère intervenant dans la formation des groupes naturels de Bactéries. Ainsi les suspensions de *B. caryocyaneus* et de *B. pyocyaneus* qui s'éclaircissent presque instantanément sous l'action des ions OH^- présentent peut-être là un caractère très important pour la diagnose de l'espèce bactérienne.



CHAPITRE V

Influence des électrolytes sur les variations de volume des corps microbiens et sur les variations de fixation d'un colorant par les mêmes éléments en fonction du sulfocyanure de potassium

Généralités

En 1931, LASSEUR, DOMBRAY et MOREL ont constaté une action très irrégulière du chlorure de sodium sur le volume des corps microbiens en présence de sulfocyanure de potassium. Le sulfocyanure de potassium détermine toujours, nous l'avons vu, une contraction des éléments microbiens mis en suspension dans l'eau distillée; mais, on observe tantôt une augmentation, tantôt une diminution du volume sous l'influence de ce même électrolyte lorsque les plastides sont en suspension dans l'eau physiologique.

Si l'on compare la plastide bactérienne au sac à membrane semi-perméable imaginé par J. DUCLAUX (1920), on peut supposer que les corps microbiens (si leur membrane est élastique), augmentent de volume lorsqu'on les transporte dans l'eau distillée (puisque la plastide renferme des électrolytes); alors qu'ils se contractent quand ils sont mis en suspension dans une solution d'électrolytes. C'est la raison pour laquelle, en collaboration avec LASSEUR et DUPAIX (1932), nous avons entrepris une série de recherches destinées à mettre en évidence les variations de volume des plastides d'une Bactérie: *B. caryocyaneus* BEIJERINCK-DUPAIX, sous l'influence du sulfocyanure de potassium, en fonction de quantités croissantes de chlorure de sodium.

Recherches personnelles

TECHNIQUE

MILIEU DE CULTURE. ENSEMENCEMENT. PRÉPARATION DES SUSPENSIONS

En ce qui concerne le milieu de culture, l'ensemencement, la préparation des suspensions, nous prions le Lecteur de bien vouloir se reporter à la page 42 où ces opérations ont été décrites en détail.

Première série d'essais.

PROTOCOLE D'EXPÉRIENCE

Dans des tubes A, B, C..., on distribue successivement la suspension microbienne, l'eau distillée, additionnée ou non de chlorure de sodium et la solution de sulfocyanure de potassium d'après le schéma ci-dessous :

- A = 3 cm³ suspension + 12 cm³ eau distillée;
 B = 3 cm³ suspension + 9 cm³ eau distillée + 3 cm³ solution KSCN 4 N/1;
 C = 3 cm³ suspension + 12 cm³ eau distillée additionnée de 9 gr. 0/00 NaCl;
 D = 3 cm³ suspension + 9 cm³ eau distillée additionnée de 9 gr. 0/00 NaCl + 3 cm³ solution KSCN 4 N/1;
 E = 3 cm³ suspension + 12 cm³ eau distillée additionnée de 18 gr. 0/00 NaCl;
 F = 3 cm³ suspension + 9 cm³ eau distillée additionnée de 18 gr. 0/00 NaCl + 3 cm³ solution KSCN 4 N/1;
 G = 3 cm³ suspension + 12 cm³ eau distillée additionnée de 36 gr. 0/00 NaCl;
 H = 3 cm³ suspension + 9 cm³ eau distillée additionnée de 36 gr. 0/00 NaCl + 3 cm³ solution KSCN 4 N/1;
 I = 3 cm³ suspension + 12 cm³ eau distillée additionnée de 39 gr. 0/00 NaCl;
 J = 3 cm³ suspension + 9 cm³ eau distillée additionnée de 39 gr. 0/00 NaCl + 3 cm³ solution KSCN 4 N/1.

Nous résumons dans les deux tableaux suivants les résultats obtenus au cours de ces expériences. Le tableau XII met plus particulièrement en évidence l'action du chlorure de sodium sur le volume des plastides de *B. caryocyanus* et le tableau XIII, l'action du sulfocyanure de potassium sur le volume de ces mêmes corps microbiens dans les systèmes additionnés de chlorure de sodium.

Variation de volume des plastides de *B. caryocyanus*

TABLEAU XII

DÉSIGNATION des tubes	NATURE DES LIQUIDES DISPERSIFS	VOLUME DES PLASTIDES DE <i>B. caryocyanus</i>	
		en l'absence de KSCN	en présence de KSCN
A	Eau distillée.....	0,140	0,100
B	Eau distillée + 9 gr. 0/00 NaCl	0,100	0,100
C	Eau distillée + 18 gr. 0/00 NaCl	0,100	0,100
D	Eau distillée + 36 gr. 0/00 NaCl	0,125-130	0,130-140

TABLEAU XIII

DÉSI- GNA- TION des tubes	COMPOSITION DES SYSTÈMES	VOLUME DES PLASTIDES DE <i>B. caryocyaneus</i>	
		Expér. n° 1	Expér. n° 2
Suspension bactérienne additionnée de :			
A	Eau distillée.....	0,140	0,190
B	Eau distillée + KSCN.....	0,100	0,125
C	Eau distillée + 9 gr. 0/00 NaCl.....	0,100	0,150
D	Eau distillée + 9 gr. 0/00 NaCl + KSCN.....	0,100	0,125
E	Eau distillée + 18 gr. 0/00 NaCl....	0,100	
F	Eau distillée + 18 gr. 0/00 NaCl + KSCN.....	0,100	
G	Eau distillée + 36 gr. 0/00 NaCl....	0,125-130	
H	Eau distillée + 36 gr. 0/00 NaCl + KSCN.....	0,130-140	
I	Eau distillée + 39 gr. 0/00 NaCl....		0,175-180
J	Eau distillée + 39 gr. 0/00 NaCl + KSCN.....		0,180-190

Il résulte de l'examen du tableau XII que l'addition de chlorure de sodium à l'eau distillée détermine une diminution de volume des plastides de *B. caryocyaneus*. Mais la contraction ne croît pas avec la concentration des systèmes en chlorure de sodium : ainsi, le système D, réalisé avec une solution de chlorure de sodium à 36 gr. par litre, offre un volume plus élevé que le système A où la quantité de chlorure de sodium est quatre fois plus faible.

Dans le tableau XIII nous constatons que l'addition de sulfocyanure de potassium aux mélanges contenant du chlorure de sodium ne contracte pas sensiblement le volume des corps microbiens, comparativement au volume présenté par ces mêmes éléments en présence de sulfocyanure de potassium seul. Et même, pour les fortes concentrations en NaCl (36 gr. et 39 gr. par litre), l'ion SCN— détermine un gonflement des plastides de *B. caryocyaneus*, de telle sorte que les corps microbiens offrent un volume du même ordre que celui observé dans l'eau distillée.

Comparons maintenant les résultats obtenus dans l'eau distillée et dans l'eau physiologique, nous constatons que le transport des corps microbiens dans l'eau distillée provoque un gonflement de l'élément anatomique. Il

en est de même lorsqu'on utilise au lieu d'eau distillée, l'eau renfermant 36-39 grammes de chlorure de sodium par litre. Enfin, si, à l'eau distillée contenant 36-39 grammes de chlorure de sodium par litre, on ajoute du sulfocyanure de potassium, on note un volume qui est sensiblement le même que celui des corps microbiens mis en suspension dans l'eau distillée. Dans ce dernier cas il y aurait donc eu gonflement des corps microbiens par rapport au volume mesuré dans l'eau physiologique.

En résumé, le sulfocyanure de potassium agit différemment sur le volume des plastides de *B. caryocyanus* suivant que l'on opère sur des suspensions réalisées dans l'eau distillée ou dans l'eau distillée additionnée de chlorure de sodium.

Deuxième série d'essais.

Des irrégularités notées au cours de ces expériences, nous avaient laissé supposer que la concentration des systèmes en corps microbiens pouvait influencer la marche du phénomène. Aussi avons-nous institué une série d'essais d'après les schémas indiqués ci-dessous :

SCHÉMA I

- A = 3 cm³ suspension + 12 cm³ eau distillée;
- B = 3 cm³ suspension + 9 cm³ solution NaCl à 39 gr. 0/00 + 3 cm³ eau distillée;;
- C = 3 cm³ suspension + 9 cm³ eau distillée + 3 cm³ solution KSCN 4 N/1;
- D = 3 cm³ suspension + 9 cm³ solution NaCl à 39 gr. 0/00 + 3 cm³ solution KSCN 4 N/1.

SCHÉMA II

- A = 4 cm³ suspension + 11 cm³ eau distillée;
- B = 4 cm³ suspension + 8 cm³ solution NaCl à 39 gr. 0/00 + 3 cm³ eau distillée;
- C = 4 cm³ suspension + 8 cm³ eau distillée + 3 cm³ solution KSCN 4 N/1;
- D = 4 cm³ suspension + 8 cm³ solution NaCl à 39 gr. 0/00 + 3 cm³ solution KSCN 4 N/1.

SCHÉMA III

- A = 2 cm³ suspension + 13 cm³ eau distillée;
- B = 2 cm³ suspension + 8 cm³ solution NaCl à 39 gr. 0/00 + 5 cm³ eau distillée;
- C = 2 cm³ suspension + 10 cm³ eau distillée + 3 cm³ solution KSCN 4 N/1;
- D = 2 cm³ suspension + 8 cm³ solution NaCl à 39 gr. 0/00 + 2 cm³ eau distillée + 3 cm³ solution KSCN 4 N/1.

Nous schématisons les résultats obtenus dans le tableau XIV.

TABLEAU XIV

Action des électrolytes sur le volume de *B. caryocyaneus*
dans les systèmes renfermant des quantités variables de corps microbiens.

DÉSIGNATION des tubes	COMPOSITION DES SYSTÈMES Suspension additionnée de :	VOLUME DES PLASTIDES			
		Schéma I		Schéma II	Schéma III
		Exp. n° 1	Exp. n° 2		
A	Eau distillée.....	0,250	0,350	0,495	0,240
B	Chlorure de sodium.....	0,175-180	0,250	0,400-405	0,175-180
C	Sulfocyanure de potassium....	0,190	0,270	0,330-340	0,155
D	Chlorure de sodium + sulfocyanure de potassium.....	0,180-190	0,260	0,350	0,160-175

L'examen du tableau XIV montre que :

- 1° les électrolytes contractent les éléments microbiens;
- 2° suivant les conditions d'expérience le chlorure de sodium, ou le sulfocyanure de potassium provoque le maximum de contraction.
- 3° lorsqu'on fait agir simultanément les deux électrolytes, le mélange se comporte, soit comme le sulfocyanure de potassium seul, soit comme le chlorure de sodium seul.
- 4° la variation de concentration en corps microbiens ne détermine pas de modifications sensibles dans l'allure du phénomène. Il faut donc attribuer à d'autres facteurs d'action les irrégularités observées au cours de cette expérimentation.

Après avoir envisagé l'action du chlorure de sodium sur le volume des éléments microbiens, il nous a semblé intéressant de chercher comment se comportent les plastides de *B. caryocyaneus* vis-à-vis de différents chlorures et de savoir si, dans les processus que nous étudions, il est possible d'établir des séries de cations, analogues aux séries d'HOFMEISTER.

A cet effet, nous avons entrepris, en collaboration avec LASSEUR et DUPAIX des recherches systématiques sur *B. caryocyaneus* BEIJERINCK-DUPAIX, afin de mesurer les variations de volume des plastides bactériennes sous l'influence de différents chlorures (chlorure de sodium, chlorure de lithium, chlorure de magnésium, chlorure de calcium) en présence et en l'absence de sulfocyanure de potassium et les variations de fixation d'un

colorant (Bordeaux B) par les éléments bactériens en fonction des mêmes électrolytes.

Troisième série d'essais.

PROTOCOLE D'EXPÉRIENCE

Des séries de tubes A, B, C..., reçoivent successivement : la suspension microbienne, la solution colorante, la solution de sulfocyanure de potassium, la solution de chlorure et l'eau distillée d'après le schéma suivant :

TABLEAU XV

DÉSIGNATION des tubes	SUSPENSION microbienne	SOLUTION colorante	SOLUTION de sulfocyanure de potass. 4 N/1	SOLUTION de chlorure N/1	EAU distillée
A	3 cm ³	3,6 cm ³	0	0	8,4 cm ³
B	3 cm ³	3,6 cm ³	3 cm ³	0	5,4 cm ³
C	3 cm ³	3,6 cm ³	0	5,4 cm ³	3 cm ³
D	3 cm ³	3,6 cm ³	3 cm ³	5,4 cm ³	0

On laisse en contact trente minutes puis on détermine le volume des corps microbiens et la quantité de colorant fixée.

Solutions d'électrolytes.

La solution de sulfocyanure de potassium, de concentration 4N/1, est titrée par la méthode de CHARPENTIER-VOLHARD (1) puis vérifiée quant au titre.

Les solutions de chlorures (chlorures de sodium, de lithium, de magnésium et de calcium) sont effectuées à la concentration N/1, puis tyndalisées elles aussi, des dosages ayant montré que cette opération ne modifie pas le titre des solutions.

Solution colorante.

Comme dans les essais précédents (chapitre II), nous avons employé le

(1) Voir page 42.

Bordeaux B, à la concentration de 0 gr. 600 de colorant pour mille grammes d'eau distillée.

Mesure des paramètres.

Le volume des corps microbiens et la quantité de colorant fixée ont été mesurés suivant la technique indiquée page 45.

RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX

Comme dans toute expérimentation, je considérerai d'abord les faits, puis leur interprétation.

1° Les faits.

Nous envisagerons successivement les faits relatifs aux variations de volume et aux variations de fixation du colorant.

A) Volume des plastides.

Nous relatons dans les tableaux XVI et XVII les modifications de volume des plastides de *B. caryocyaneus* mises respectivement en contact avec l'eau distillée et l'eau distillée additionnée d'électrolytes, et cela en présence ou en l'absence de colorant.

A priori, on peut imaginer que le colorant détermine des variations de volume des plastides bactériennes assez importantes et qu'il constitue par suite une cause d'erreur grave dans l'étude de l'influence des électrolytes sur le volume des corps microbiens. L'expérience montre que le colorant utilisé ne modifie pas sensiblement le volume des corps microbiens. Les variations observées sont de l'ordre de grandeur des erreurs d'expérience. Aussi dans les tableaux XVI et XVII ferons-nous figurer les résultats obtenus non seulement avec les systèmes dépourvus de colorant, mais encore avec les suspensions auxquelles on a ajouté préalablement du Bordeaux B.

TABEAU XVI

Action de différents chlorures (chlorures de sodium, de lithium, de magnésium et de calcium) sur le volume des plastides de *B. carvocyaneus* BEIJERINCK-DUPAIX.

DÉSIGNATION des systèmes	SUSPENSION additionnée de :	VOLUME DES PLASTIDES OBSERVÉ DANS LES EXPÉRIENCES							Σ
		N° 1	N° 2	N° 3	N° 4	N° 5	N° 6	N° 7	
A	Eau distillée.....	0,180	0,280	0,295-300	0,190	0,495	0,350	0,240	
B	Chlorure de sodium.....	0,160-165	0,240	0,230-240	0,170	0,400-405	0,250	0,175-180	
C	Chlorure de lithium....	0,130-140	0,200	0,200-205	0,140				
D	Chlorure de magnésium..	0,130	0,200	0,200	0,145				
E	Chlorure de calcium....	0,145	0,225	0,200	0,145				

TABLEAU XVII

Action du sulfocyanure de potassium et de différents chlorures
(chlorures de sodium, de lithium, de magnésium et de calcium)
sur le volume des plastides de *B. carvovyanus* BEIJERINCK-DUPAIN.

DÉSIGNATION des systèmes	SUSPENSION additionnée de :	VOLUME DES PLASTIDES OBSERVÉ DANS LES EXPÉRIENCES				
		N° 1	N° 2	N° 3	N° 4	N° 5
A	Eau distillée.....	0,180	0,280	0,295-300	0,495	0,190
B	Sulfocyanure de potassium.	0,135-140	0,230	0,245-250	0,330-340	0,140
C	Chlorure de sodium.....	0,160-165	0,240	0,230-240	0,400-405	0,170
D	Chlorure de sodium + sul- focyanure de potassium..	0,140-145	0,230	0,245-250	0,160-165	0,150-155
E	Chlorure de lithium.....	0,130-140	0,200	0,200-205	0,140	
F	Chlorure de lithium + sul- focyanure de potassium..	0,120	0,240	0,240	0,140	
G	Chlorure de magnésium...	0,130	0,200	0,200	0,145	
H	Chlorure de magnésium + sulfocyanure de potassium	0,120-125	0,200-210	0,225-230	0,120-130	
I	Chlorure de calcium.....	0,145	0,225	0,200	0,145	
J	Chlorure de calcium + sul- focyanure de potassium..	0,130	0,250	0,245-250	0,140	

2° Interprétation des faits.

Afin de faciliter l'exposition des résultats nous exprimerons conventionnellement la contraction de volume par le quotient du rapport :

$$\frac{\text{Volume des plastides dans la solution d'électrolyte considérée}}{\text{Volume des plastides dans l'eau distillée}}$$

De l'examen des tableaux XVI et XVII il résulte que :

1) L'addition de sulfocyanure de potassium aux suspensions de *B. caryocyaneus* détermine toujours une contraction de volume des corps microbiens comparativement au volume présenté par ces mêmes éléments dans l'eau distillée. Cette diminution de volume est assez constante, elle oscille en général entre 0,65 et 0,82 (moyenne arithmétique : 0,76, nombre probable de LE CHATELIER : 0,77).

2) De même l'addition de chlorures à l'eau distillée détermine une contraction de volume des corps microbiens comparativement au volume présenté par ces mêmes éléments dans l'eau distillée. Cette diminution de volume varie de 0,66 à 0,90.

3) La contraction due au chlorure de sodium est incontestablement plus faible que celle provoquée par les trois autres électrolytes. En effet, avec les quatre chlorures on observe les contractions moyennes suivantes :

Chlorure de sodium : 0,81 ;

Chlorure de lithium : 0,71 ;

Chlorure de magnésium : 0,71 ;

Chlorure de calcium : 0,75.

Le chlorure de lithium et le chlorure de magnésium se comportent sensiblement de la même façon. Si on classe les cations d'après leur pouvoir contractant vis-à-vis des plastides de *B. caryocyaneus*, on obtient la série suivante : $\text{Na} < \text{Ca} < \text{Mg}, \text{Li}$.

4) Le chlorure de sodium détermine une contraction (0,81) inférieure à celle du sulfocyanure de potassium (0,76) et les Bactéries mises au contact du mélange *sulfocyanure de potassium-chlorure de sodium* présentent une diminution de volume (0,75) voisine de celle qui est provoquée par le sulfocyanure de potassium seul.

5) Avec les autres chlorures (chlorure de lithium, chlorure de magné-

sium, chlorure de calcium) en présence de sulfocyanure de potassium les résultats obtenus sont trop discordants pour permettre une généralisation.

Il semble que le sulfocyanure de potassium modifie la perméabilité de la membrane de façon irrégulière quand il est en présence d'un chlorure autre que le chlorure de sodium. Pour expliquer ces anomalies on pourrait être tenté d'émettre les deux hypothèses suivantes :

1) *Erreurs de mesure.* — Les variations s'inscrivant tantôt dans un sens tantôt dans un autre sembleraient donner quelque créance à cette conception, mais elle ne paraît pas devoir être retenue puisqu'avec le chlorure de sodium et le sulfocyanure de potassium les résultats sont constants. De plus, dans d'autres essais, relatifs à l'agglutination par exemple, ces procédés de mesure donnent d'excellents résultats.

2) *Hétérogénéité du matériel.* — Les suspensions effectuées avec des cultures de même âge ne sont pas rigoureusement identiques; par suite de l'hétérogénéité du matériel, la fluctuation masque la tendance générale.

B) *Fixation du colorant.*

Nous venons de voir que les variations de volume en fonction de certains électrolytes sont très difficiles à interpréter. Il n'en est pas de même lorsqu'on s'adresse à la fixation du colorant en présence de ces mêmes électrolytes, ainsi que le montre l'examen des tableaux suivants :

TABLEAU XVIII

Fixation d'un colorant (Bordeaux B) par les plastides
de *B. caryocaneus* BEIJERINCK-DUPAIX en présence de différents chlorures.

DÉSIGNA- TION des systèmes	SUSPENSION ADDITIONNÉE DE :	QUANTITÉ DE COLORANT FIXÉE exprimée en milligr. 0/00
A	Eau distillée.....	2 ?
B	Chlorure de sodium.....	44
C	Chlorure de lithium.....	16,5
D	Chlorure de magnésium.....	47,5
E	Chlorure de calcium.....	69

TABLEAU XIX

Fixation d'un colorant (Bordeaux B) par les plastides de *B. caryocyaneus* BEIJERINCK-DUPAIX en présence de sulfocyanure de potassium et de différents chlorures.

DÉSIGNA- TION des systèmes	SUSPENSION ADDITIONNÉE DE	QUANTITÉ DE COLORANT FIXÉE exprimée en milligr. 0/00
A	Eau distillée.....	2 ?
B	Sulfocyanure de potassium.....	32,5
C	Sulfocyanure de potassium + chlorure de sodium	79,25
D	Sulfocyanure de potassium + chlorure de lithium	79,25
E	Sulfocyanure de potassium + chlorure de magnésium	86,75
F	Sulfocyanure de potassium + chlorure de calcium	104,25

Considérons successivement les tableaux XVIII et XIX. Nous constatons que :

- 1) En l'absence d'électrolytes la fixation du colorant par les plastides bactériennes est extrêmement faible.
- 2) Les électrolytes augmentent la fixation du colorant.
- 3) Cette augmentation varie avec l'électrolyte considéré.
- 4) Si on classe les cations d'après leur pouvoir favorisant la pénétration du colorant, on obtient la série suivante :

$Li < Na < Mg < Ca$, différente de la série de HOFMEISTER. Dans cette série nous retrouvons la position de $Li < Na$, comme elle a été signalée précédemment par HÖBER dans la précipitation des albumines (p. 269, 1922).

5) Conformément à la théorie de BOAS, l'addition de sulfocyanure de potassium à la solution de chlorure augmente la fixation du colorant par les plastides bactériennes. Si, après addition du sulfocyanure de potassium, on cherche à classer les cations suivant leur pouvoir favorisant la fixation du Bordeaux B, on obtient la série suivante :

$Na, Li < Mg < Ca$ dans laquelle tout Lecteur reconnaîtra la série d'HOFMEISTER.

En résumé, les plastides bactériennes mises au contact d'un mélange de sulfocyanure de potassium, de chlorure et de colorant montrent :

- 1) des variations de volume qui ne sont pas en harmonie avec l'hypothèse de BOAS.
- 2) une augmentation de la fixation du colorant conforme à la théorie de BOAS.

CHAPITRE VI

Influence de la tension superficielle sur la vie de quelques Bactéries⁽¹⁾

Généralités et historique

Dans les chapitres précédents j'ai envisagé quelques facteurs susceptibles de jouer un rôle dans le phénomène de BOAS. Jusqu'à présent je n'ai pas fait appel à la tension superficielle. Or, un ensemble de travaux fort importants semble démontrer que la vie des Bactéries n'est possible que dans des limites de tension superficielle bien déterminées. On est donc en droit de se demander si l'action du sulfocyanure de potassium ne peut pas être ramenée en partie à la variation de ce paramètre.

Je voudrais dans ce chapitre relater les essais effectués dans cette voie.

Auparavant il me paraît indispensable de résumer l'ensemble des faits observés par mes devanciers et d'essayer, par une discussion critique, de préciser le rôle de la tension superficielle dans la vie des Bactéries.

La phrase ci-dessus laisse sous-entendre au Lecteur que l'accord général n'est pas fait en ce qui concerne la relation que l'on peut établir entre la tension superficielle et la vie des Bactéries.

Que l'on soit obligé de classer en deux catégories : physique et chimique, les différentes théories proposées, rien de plus naturel, mais la démarcation entre les deux disciplines n'est pas toujours très rigoureuse (2); de plus, les faits eux-mêmes sont souvent contestés; enfin et surtout, un auteur confirme parfois une partie des travaux de ses devanciers tout en arrivant à des conclusions diamétralement opposées dans une autre partie de ses recherches. Il en résulte une extrême complexité de l'historique de cette question et nous nous excusons si, pour la facilité de l'exposition, nous ne nous conformons pas à l'ordre chronologique.

(1) Pour la rédaction de ce chapitre, je fais des emprunts au mémoire publié en collaboration avec M. le Professeur LASSEUR, P. VERNIER et A. DUPAIX in *Archiv f. Mikrobiologie*, Bd. 3, Heft 5, 1932.

(2) On a essayé de caractériser la physique et la chimie respectivement par le continu et le discontinu. Dans les phénomènes qu'étudie le physico-chimiste « le continu et le discontinu se trouvent imbriqués l'un dans l'autre en un assemblage inséparable » (J. PERRIN 1930). Or, depuis quelques années, la discontinuité s'est introduite en physique.

Avant d'analyser les travaux relatifs à la culture des Bactéries en milieu de tension superficielle abaissée, nous résumerons quelques recherches concernant l'action possible de la tension superficielle sur la division cellulaire et le pouvoir antiseptique de différentes substances.

AYERS, RUPP et JOHNSON (1923) rappellent que BUTSCHLI (1876) avait tenté d'établir une relation entre la tension superficielle et la division cellulaire. Une bonne revue de la littérature afférente à cette question a été donnée par MACALLUM en 1912. Dans l'impossibilité de faire l'historique de tous les travaux ayant trait à l'influence de la tension superficielle sur la multiplication des cellules en général, nous devons nous limiter aux Bactéries; et même nous ne pouvons pas entrer dans l'analyse des travaux qui cherchent à établir une relation entre la tension superficielle et le pouvoir antiseptique d'une substance, cette étude nous entraînerait beaucoup trop loin; nous nous contenterons de mentionner les recherches de KISCH (1912), BERZELLER (1914), CHRISTIANSEN (1918), BOESEKEN et WATERMAN (1912) et HANSEN (1922).

KISCH (1912) arrive aux conclusions suivantes: lorsqu'une substance tensioactive abaisse la tension superficielle d'un système aux environs de 36 dynes, elle est capable de déterminer une « *permanent injury* » chez les Levures; les Bactéries ne seraient pas aussi sensibles que les Levures à l'abaissement de tension superficielle et l'auteur en conclut que le protoplasma des deux groupes d'organismes doit être différent.

L. BERZELLER (1914) étudie la tension superficielle de différentes substances. L'auteur admet une relation entre la tension superficielle et le pouvoir antiseptique; mais il y a lieu de remarquer que BERZELLER n'a pas expérimenté personnellement sur les Bactéries.

J. CHRISTIANSEN (1918) établit un parallélisme entre le pouvoir désinfectant des alcools et leur tension superficielle. Par contre BOESEKEN et WATERMAN (1912) étudiant l'action de la tension superficielle sur *Penicillium glaucum* concluent à un rôle secondaire de la tension superficielle. Th. HANSEN (1922) constate que l'addition d'alcool à des solutions chlorhydriques abaisse leur tension superficielle et augmente leur pouvoir antiseptique; mais les différentes substances tensioactives n'ayant pas la même action sur les « *désinfectants* », HANSEN pense que l'augmentation du pouvoir bactéricide n'est pas due à la chute de la tension superficielle, mais à une variation de la perméabilité de la membrane.

Nous pourrions multiplier la liste des travaux relatifs à cette question sans projeter beaucoup plus de lumière sur le sujet qui nous intéresse. Aussi allons-nous immédiatement envisager les travaux qui ont trait au dévelop-

pement des Bactéries dans des milieux additionnés de substances tensio-actives.

Les auteurs américains rappellent qu' Avery (1918) a étudié l'action inhibitrice des savons sur le développement du Bacille de l'influenza. Ce savant ne paraît pas avoir été plus préoccupé par l'idée de tension superficielle que tous les auteurs qui depuis Mac CONKEY (1900) et DUNCHMANN ont préconisé l'emploi de la bile ou des sels biliaires dans la recherche du Bacille typhique ou du Colibacille dans les eaux.

Il semble donc que c'est bien à LARSON, CANTWELL et HARTZELL (1919) que revient l'honneur d'avoir mis en évidence l'action de la tension superficielle sur la croissance des Bactéries. Ces auteurs abaissent la tension superficielle par addition d'huile de ricin au bouillon nutritif : lorsque la tension superficielle tombe au-dessous de 45 dynes, on observe des modifications notables de l'aspect des cultures bactériennes : c'est ainsi qu'on assiste à la disparition du voile dans les cultures de Bactéries qui normalement se développent surtout en surface.

Dans les expériences de LARSON (1921) (abaissement de la tension superficielle par addition de ricinoléate) le Streptocoque et le Staphylocoque poussent encore à 50 dynes, *B. anthracis* ne peut pas se multiplier au-dessous de 46 dynes.

Par contre, FROBISCHER (1926) et PIZARRO (1927) nient l'action de la tension superficielle sur le Streptocoque.

En abaissant la tension superficielle des milieux par addition de ricinoléate, de glycocholate ou d'oléate de soude, AYERS, RUPP et JOHNSON (1923) obtiennent des résultats analogues à ceux de LARSON. Ces auteurs cultivent tout d'abord 5 espèces de Streptocoque sur des milieux additionnés de ricinoléate, de taurocholate et de glycocholate, et, dont la tension superficielle varie de 35,9 dynes à 59,6 dynes. Il résulte de ces essais que certains Streptocoques montrent un retard de croissance à 53 dynes et un arrêt de végétation à 45 dynes. Pour d'autres Streptocoques, le retard de la multiplication bactérienne se produit à 43 dynes et ce n'est que vers 40 dynes que toute végétation cesse.

Le Colibacille paraît particulièrement résistant aux abaissements de tension superficielle, il pousse encore dans un milieu dont la tension superficielle est abaissée à 35 dynes (AYERS, RUPP et JOHNSON) et même à 32 dynes (LARSON). C'est un fait sur lequel LARSON, CANTWELL et HARTZELL (1919) ont déjà attiré l'attention et qu'ils se sont efforcés d'interpréter en le ramenant à un phénomène d'accoutumance, phénomène nettement mis en évidence dans les recherches d'AYERS, RUPP et JOHNSON sur le Streptocoque. En effet, les Streptocoques qui ont été cultivés sur un milieu peptoné

dextrosé de tension superficielle égale à 59 dynes peuvent pousser ultérieurement dans les milieux dont la tension superficielle est abaissée à 40 dynes.

LARSON et MONTANK (1923) ont signalé une particularité bien intéressante: c'est la perte du pouvoir pathogène du Bacille tuberculeux cultivé en présence de savon. La variation du pouvoir pathogène serait liée, dans ce cas, à un abaissement de la tension superficielle du milieu. Ce fait nous paraît d'autant plus vraisemblable que CALMETTE et GUÉRIN ont obtenu le célèbre B. C. G. par culture du Bacille tuberculeux en milieu bilité.

Dans un ensemble d'admirables recherches systématiques poursuivies depuis 1907 sur les cryptotoxines, H. VINCENT a montré que les savons ont la propriété de neutraliser les toxines microbiennes. Ce fait est à rapprocher de la variation du pouvoir pathogène des Bactéries sous l'influence de substances tensioactives.

De même NETTER, CESARI et COTONI (1927) ont envisagé l'action du ricinoléate de sodium dans l'immunisation streptococcique et pneumococcique.

F. BOAS et G. NEUMULLER (1930) ont longuement étudié la croissance de différents organismes des fermentations (*Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces anamensis*, *Torula*) dans des milieux additionnés d'une dose constante de glycocholate de soude et de concentration croissante en NaCl. Ces deux savants font donc varier la tension superficielle à l'aide de deux sels de sodium. Il est bien évident que lorsqu'on atteint des concentrations égales à 0,8 M, 0,9 M ou 1 M en NaCl, il y a d'autres phénomènes qui interviennent que celui de la tension superficielle. Sous ces réserves, les germes étudiés par BOAS et NEUMULLER paraissent présenter une assez grande résistance à l'abaissement de tension superficielle.

En ce qui concerne la tension superficielle des mélanges: glycocholate de soude et chlorure de sodium, nous rappellerons que E. DOUMER et Edmond DOUMER (1921) dans trois notes à la Société de Biologie ont étudié l'action secondaire des fortes concentrations de NaCl sur la tension superficielle des solutions de glycocholate de soude.

Nous devons à KOPACZEWSKI (1923) une série d'observations sur les modifications physico-chimiques provoquées par les Bactéries dans les milieux de culture. Ce savant a déterminé la tension superficielle, la viscosité, la conductivité électrique et le pH à différents stades de l'évolution des cultures. KOPACZEWSKI pense que l'abaissement de la tension superficielle peut déterminer une lyse bactérienne.

Dans un mémoire paru en 1931 (*Archiv für Mikrobiologie*), KOPACZEWSKI résume ses recherches sur les conditions physico-chimiques de la vitalité microbienne. Dans cette publication, l'auteur a eu

surtout en vue l'antagonisme bactérien ; par suite, il a essentiellement noté les transformations corrélatives au développement des Bactéries.

Avant d'envisager les différentes théories proposées pour expliquer ces phénomènes, nous résumons sous forme de tableau les faits qui paraissent établir une relation entre la tension superficielle des milieux et la vie des Bactéries.

TABLEAU XX

ESPÈCES BACTÉRIENNES étudiées	SUBSTANCES tensioactives ajoutées	TENSION superficielle minimum de croissance en dynes-cm.	MODIFICA- TIONS déterminées par des tensions superficielles basses	AUTEURS
Bacilles aérobies..	Huile de ricin		perte du voile	LARSON, CANTWELL, HARTZELL, (1919).
<i>B. anthracis</i>	Ricinoléate	46		LARSON (1921)
Bacille tuberculeux	Savons		perte du pouvoir pathogène	LARSON, MONTANK (1923)
Bacille bulgare...	Ricinoléate, glycocholate, taurocholate.	40		ALBUS et HOLM (1927)
Lactobacille acido- phile	Ricinoléate	< 36		ALBUS et HOLM (1927)
Colibacille		< 42,3	modification de croissance mais le germe pousse encore à 42,3 dynes	ALBUS (1927)
Pneumocoque		35		AYERS, RUPP, JOHNSON (1923)
Streptocoque		32		LARSON (1919)
		50		LARSON CANTWELL, HARTZELL.
Streptocoque (cer- taines souches).	Ricinoléate } Oléate } Glycocholate }	40 (arrêt de croissance)	45-43 (retard dans la croissance)	AYERS, RUPP, JOHNSON.
(autres souches)...		45	53	

Si différentes observations tendent à établir le rôle de la tension superficielle, il ne faut pas oublier que certains auteurs nient toute action de la tension superficielle sur les processus vitaux; et nous sommes ainsi conduits à l'examen de la théorie chimique.

THEORIE CHIMIQUE

Dans cette conception des faits, les substances tensioactives agissent par leur nature chimique et non par un abaissement de tension superficielle. C'est l'avis de GIBBS, BATCHELOR et SICKELS (1926). En faveur de leur hypothèse, ces auteurs font remarquer que l'abaissement de la tension superficielle par différentes substances ne détermine pas les mêmes modifications dans la vie d'une Bactérie donnée, faits déjà observés par AYERS, RUPP et JOHNSON (1923). Et on peut se demander si le trouble apporté dans les processus bactériens est dû à l'abaissement de la tension superficielle ou à la nature chimique de la substance tensioactive.

Alexander A. DAY et William MERRIOTT GIBBS (1928) expérimentant sur le ricinoléate de soude arrivent à des conclusions analogues. ALBUS (1927) constate lui aussi que, pour une même valeur de tension superficielle, des substances tensioactives différentes n'agissent pas de façon identique sur les Bactéries et pour expliquer ces phénomènes l'auteur croit devoir faire intervenir « *l'effet de sel* ».

Avant de résumer les faits qui militent en faveur de la théorie physique, nous rappellerons les recherches de W.-R. ALBUS (1927); cet auteur cultive le Colibacille dans une solution peptonée à laquelle il ajoute des quantités croissantes de ricinoléate de sodium. La numération des germes effectuée après des temps variant de $t = 0$ à $t = 19$ heures montre que le nombre des Bacilles croît jusqu'à la neuvième heure, à partir de ce temps il décroît pour tous les milieux renfermant du ricinoléate. La décroissance est d'autant plus rapide que la tension superficielle du milieu est plus basse. Cet exemple montre que, suivant le stade d'évolution de la culture, on peut être conduit à des conclusions diamétralement opposées. Il faut donc être très prudent dans l'interprétation des expériences de ce genre.

THEORIE PHYSIQUE

L'étude la plus documentaire que nous pouvons placer à la base de cette théorie se trouve incontestablement dans les belles recherches de Pierre

GIRARD (1921) et Pierre GIRARD et R. AUDUBERT (1918) relatives à « l'action des sels de terres rares sur les cellules microbiennes ».

Pierre GIRARD s'est plus particulièrement préoccupé de la différence de potentiel de la couche double. Pour ce savant un abaissement de la valeur de la différence de potentiel de la couche double a pour effet un accroissement de la cohésion micellaire. Aussi « l'effet physique qu'on peut attendre de la présence d'ions positifs polyvalents dans le milieu de culture est une contraction du protoplasme. Il se traduit par une diminution du volume cellulaire enregistrable par la méthode des tubes hématocrites » (1) (Pierre GIRARD, p. 442).

La cellule dont le protoplasme s'est condensé par suite de l'abaissement de la différence de potentiel et corrélativement de l'augmentation de la tension superficielle, résiste de façon notable à l'influence lytique du milieu (Pierre GIRARD et R. AUDUBERT, 1918).

Lorsque la différence de potentiel tend vers zéro, la tension superficielle est maximum, les plastides sont tuées dans des conditions remarquables qui « fixent » son protoplasme et respectent sa toxicité (Pierre GIRARD et R. AUDUBERT, 1918).

Pierre GIRARD en étudiant l'action des sels de terres rares sur les cellules microbiennes a montré que l'addition d'ions polyvalents aux cultures microbiennes a pour effet, suivant la concentration de ces ions, soit d'abaisser, soit même d'annuler la différence de potentiel; « ces modifications de l'état électrique de la paroi déterminent deux effets physiques: un effet électrosmotique et un effet de tension de surface... Chez la plupart des cellules microbiennes les effets osmotiques et électrosmotiques semblent extrêmement réduits. Aux modifications de l'état électrique de leur paroi correspondra un effet de tension de surface à peu près exclusif ».

BEGUET (1927) a consacré des publications très intéressantes aux problèmes biologiques et dans l'une d'elles ce savant signale une relation entre la tension superficielle et le volume des corps microbiens. L'auteur admet l'existence de deux phénomènes inverses, tension superficielle faible correspondant à un gonflement ou tension superficielle faible correspondant à une contraction des corps microbiens.

(1) « Tension de surface $t = q - 2 \pi h \varsigma$ 2; le terme q représente le travail des forces de cohésion qui s'exerce entre les micelles protoplasmiques; le terme $- 2 \pi h \varsigma$ 2 (où h représente l'épaisseur de la couche double et ς sa densité) est l'expression rapportée à l'unité de surface du travail électrique de la couche double. »

Avec FROBISCHER nous arrivons aux généralisations. Cet auteur établit en effet une relation étroite entre la tension superficielle et l'action des désinfectants.

De même KOPPELOFF et BEERMAN (1927) confirment les faits observés par ALBUS et HOLM (1926), mais ils en donnent une interprétation physique. Pour KOPPELOFF et BEERMANN, il existe une relation entre la tension superficielle du milieu nutritif et la vie des Bactéries.

Enfin KOPACZEWSKI dans diverses mises au point (1930) rappelle l'action de la tension superficielle sur la croissance des différentes cellules et des plastides microbiennes en particulier.

L'ensemble des faits exposés démontre irréfutablement que l'addition de quantités convenables de substance tensioactive peut modifier la vie de certains germes.

AYERS, RUPP, JOHNSON, KISCH, etc... pensent que les différences de réaction aux substances tensioactives correspondent à une différence de structure des microorganismes considérés. Si cette hypothèse est exacte, on ne doit pas obtenir les mêmes résultats avec les Bactéries « prenant le GRAM » et avec les Bactéries « ne prenant pas le GRAM ».

Recherches personnelles

Afin de vérifier le bien fondé de cette hypothèse, j'ai, en collaboration avec Ph. LASSEUR, P. VERNIER et A. DUPAIX, effectué une série de recherches relatives à l'action des substances tensioactives sur : Bacille rouge d'Essey, *B. prodigiosus* (étoile rouge) (1), *B. prodigiosus* (rond rouge) (1). *B. prodigiosus* blanc, *B. caryocyanus*, *B. cyaneo-fluorescens*, *B. chlororaphis*, *B. pyocyanus* var. *pyocyanogenes* *B. pyocyanus* var. *erythrogenes*, *B. megatherium*, *B. subtilis* et *B. mesentericus niger*.

Malheureusement, dans l'expérimentation, on se heurte immédiatement à une série de difficultés sur lesquelles nous attirerons l'attention et en particulier à la variation de l'influence des substances tensioactives avec le milieu de culture utilisé. Aussi avons-nous employé d'une part un milieu synthétique : le milieu L₁ de LASSEUR et d'autre part un milieu non chimiquement défini : la solution peptonée.

Chaque liquide a été additionné de taurocholate de soude et de glycolate de soude à des concentrations variant de 0 gr. 0156 à 1 gramme %.

(1) Les dénominations de « étoile rouge » et de « rond rouge » évoquent la forme des colonies de *B. prodigiosus* sur plaque de gélose.

Les mesures de tension superficielle ont été effectuées à l'aide du tensiomètre de LECOMTE DU NOUY. Malgré toutes les précautions prises (centrifugation des milieux offrant un voile ou un dépôt) (1) la détermination de la tension superficielle reste approximative, car la présence de substances tensioactives se traduit souvent par la formation de bulles (mousse) qui gênent considérablement les mesures.

Il est évident que nous n'avons fait intervenir que la tension superficielle statique et, dans nos expériences, nous rappelons que cette grandeur n'a un sens que si l'on opère sur des germes restant facilement en suspension. Lorsqu'on s'adresse à de gros éléments microbiens tels que les cellules de Champignon, la sédimentation est tellement rapide que la tension superficielle au lieu de baisser monte constamment pour se rapprocher de celle de l'eau tenant en dissolution les électrolytes du milieu.

Ne pouvant pas entrer en de longs détails, je me bornerai à résumer dans les deux tableaux ci-dessous les faits observés en cultivant quelques Bactéries ; 1° sur milieu synthétique L₁ de LASSEUR additionné de taurocholate ou de glycocholate de soude ; 2° en solution peptonée additionnée de taurocholate ou de glycocholate de soude.

(1) Centrifugation effectuée dans des tubes de verre traités au préalable par le mélange sulfo-chromique.

TABLEAU XXI

Tableau comparatif de l'action du glycocholate et du taurocholate de soude (à la concentration de 0,5 %) sur la forme, la croissance et la chromogénèse de quelques Bactéries.

DÉSIGNATION des espèces bactériennes	FORME DES PLASTIDES en milieu L ₄ additionné de :		CROISSANCE DES BACTÉRIES en milieu L ₄ additionné de :		CHROMOGÉNÈSE DES BACTÉRIES en milieu L ₄ additionné de :	
	Glycocholate	Taurocholate	Glycocholate	Taurocholate	Glycocholate	Taurocholate
Bacille rouge d'Essey....	normale	léger raccourcissement des plastides	normale	normale	favorisée	favorisée
<i>B. prodigiosus</i> (étoilé rouge) (1)	normale	raccourcissement des plastides	normale	normale	normale ou favorisée	favorisée
<i>B. prodigiosus</i> (rond rouge) (1)	normale	normale	normale	normale	favorisée	favorisée
<i>B. prodigiosus</i> (blanc) (1) ..	normale	normale	normale	normale	normale	normale
<i>B. carotynancus</i>	allongement léger des plastides	normale	retard; puis végétation normale	retard; puis végétation normale	normale	normale
<i>B. cyano-fluorescens</i>	normale	normale	male	male	retardée	retardée
<i>B. chlororaphis</i>	normale	normale	normale	normale	temporairement supprimée	temporairement supprimée
<i>B. pyocyaneus</i> var. <i>pyocyaneus</i>	normale	allongement léger des plastides	retard; puis végétation normale	retard; puis végétation normale	(chlororaphine) diminuée	(chlororaphine) diminuée
<i>B. pyocyaneus</i> var. <i>pyothrogenus</i>	normale	allongement considérable des plastides	retard; puis végétation normale	retard; puis végétation normale	supprimée	supprimée
<i>B. megatherium</i>			Pas de végétation	Pas de végétation		
<i>B. subtilis</i>			Pas de végétation	Pas de végétation		
<i>B. mesentericus niger</i>			Pas de végétation	Pas de végétation		

TAB. LEAU XXII

Action de différentes concentrations de glycocholate et de taurocholate de soude sur le développement de quelques Bactéries sporogènes en solution peptonée.

CONCENTRATION		TENSION superficielle		pH	ACTION DU GLYCOCHOLATE ET DU TAUROCHOLATE SUR LA VÉGÉTATION DE :		
du milieu	en glycocholate	du milieu	en dynes/cm à 22° C		du milieu	<i>B. mesentericus niger</i>	<i>B. subtilis</i> <i>B. megatherium</i>
1. Action du glycocholate de soude							
0,500	37,9	7,32	empêchement		empêchement	empêchement	
0,250	37,2	7,31	empêchement		empêchement	empêchement	
0,125	37,2	7,27	empêchement		empêchement	empêchement	
0,062	37,5	7,27	empêchement		retard; puis végétation	retard; puis végétation	
0,031	45	7,27	retard; puis végétation		retard; puis végétation	retard; puis végétation	
0,015	49,4	7,27	végétation		retard; puis végétation	retard; puis végétation	
2. Action du taurocholate de soude							
0,500	37,5	7,18	retard; puis légère végétation		retard; puis légère végétation	Végétation normale	
0,250	38	7,25	retard; puis végétation		retard; puis végétation	Végétation normale	
0,125	43	7,29	retard; puis végétation normale		retard; puis végétation normale	Végétation normale	
0,062	47,8	7,32	retard; puis végétation normale		retard; puis végétation normale	Végétation normale	
0,031	50,6	7,32	retard; puis végétation normale		retard; puis végétation normale	Végétation normale	
0,015		7,36	retard; puis végétation normale		retard; puis végétation normale	Végétation normale	

Il résulte de ces expériences que l'addition de substances tensioactives au milieu nutritif peut déterminer des troubles importants dans la vie des Bactéries. Ces perturbations sont temporaires ou permanentes, elles affectent soit la forme, soit la multiplication, soit le pouvoir chromogène des éléments microbiens.

Comme le laissaient supposer les recherches antérieures, les différentes espèces bactériennes ne réagissent pas de la même façon aux substances tensioactives. Mais, fait non prévisible, les espèces sporogènes se sont montrées particulièrement sensibles à l'action du glycocholate et du taurocholate de soude.

L'action des substances tensioactives varie non seulement avec l'espèce bactérienne expérimentée mais encore avec la nature du milieu nutritif utilisé.

Discussion. — Il ne semble pas que toutes les modifications que nous venons de réaliser dans la vie des Bactéries puissent être imputées aux variations de la tension superficielle. En effet, lorsqu'onensemence une souche bactérienne dans deux parties aliquotes A et B d'un même milieu de culture dont les tensions superficielles sont abaissées à 37, 5 dynes/cm., dans un cas par le taurocholate de soude et dans l'autre par le glycocholate de soude, l'image de la vie en A et B peut être très différente. En d'autres termes, pour un même abaissement de tension superficielle, le taurocholate et le glycocholate de soude ne se comportent pas de la même façon vis-à-vis des Bactéries expérimentées.

CHAPITRE VII

Relation entre la tension superficielle et le volume des corps microbiens, entre la tension superficielle et la fixation d'un colorant par les mêmes éléments en fonction des ions H^+ et du sulfocyanure de potassium.

Nous avons vu dans le chapitre précédent que des variations importantes de la tension superficielle déterminent des troubles dans la vie des Bactéries, ce qui implique évidemment une relation entre la tension superficielle du milieu nutritif et la perméabilité de l'élément microbien. Or, dans les mémorables expériences de BOAS, l'anion SCN^- influe considérablement, lui aussi, sur la vie des microbes. On est donc en droit de se demander si la tension superficielle des suspensions bactériennes ne varie pas par addition de sulfocyanure de potassium. Aussi allons-nous chercher dans quelle mesure ces faits sont conformes à la réalité et s'il existe une relation entre les variations de tension superficielle et le volume des Bactéries d'une part, et la quantité de colorant fixée par les éléments microbiens d'autre part, en fonction du sulfocyanure de potassium.

Recherches personnelles

TECHNIQUE

Choix du matériel bactérien. — Comme précédemment (1), nous avons expérimenté sur une Bactérie : *B. caryocyanus* BEIJERINCK-DUPAIX 1930, et sur un Champignon : *Endomyces albicans* VUILLEMIN 1895.

Milieu de culture. Ensemencement. Préparation des suspensions. Solutions d'électrolytes. Solution colorante. Détermination des paramètres. — Afin d'éviter des redites fastidieuses, j'omets ici tout ce qui a trait au

(1) Voir page 41.

milieu de culture, à son ensemencement, à la préparation des suspensions, des solutions d'électrolytes et de la solution colorante, aux procédés de mesure et à la détermination des paramètres. Ces opérations ont été décrites en détail page 42.

RESULTATS EXPERIMENTAUX

Nous allons d'abord envisager le cas le plus simple. Etudions la tension superficielle des suspensions de *B. caryocyaneus* et d'*Endomyces albicans* additionnées respectivement d'eau distillée, de solution colorante, de solution de sulfocyanure de potassium et de solution tampon. Les résultats obtenus sont schématisés dans le tableau XXIII.

TABLEAU XXIII

Variation de volume des cellules d'*Endomyces albicans*
et des plastides de *B. caryocyaneus*, variation de tension superficielle,
en fonction du colorant, du sulfocyanure de potassium
et de la solution tampon de pH = 2,2.

DÉSIGNATION des systèmes	SUSPENSION additionnée de :	<i>Endomyces albicans</i>			<i>B. caryocyaneus</i>		
		pH	Tension superficielle en dynes/cm. à 23° C	Volume des plastides	pH	Tension superficielle en dynes/cm. à 23° C	Volume des plastides
A	Eau distillée.....		76	0,400		76,3	0,210
B	Colorant	5,42	74		6,66	75,5	
C	KSCN 4 N/5....	5,77	55,6	0,275	6,79	56,8	0,190
D	Solution tampon pH = 2,2....	2,43	75	0,310	2,74	67	0,150
E	Solution tampon pH = 2,2 + KSCN		65	0,250		64,5	0,120
F	Solution tampon pH = 2,2 + KSCN + co- lorant	2,88	63	0,165	2,90	64	0,130

Je ferai immédiatement remarquer que la valeur de 76 dynes/cm. qui figure pour la suspension d'*Endomyces albicans*, en présence d'eau distillée seulement, n'est pas une exception, car, dans d'autres séries d'essais, nous avons obtenu des valeurs variant de 73 à 76 dynes/cm.

Dans ces expériences, l'addition de colorant abaisse légèrement la tension superficielle des suspensions de *B. caryocyaneus* et d'*Endomyces albicans*.

Si nous nous limitons aux faits observés dans cette série de recherches, nous constatons qu'un faible abaissement de tension superficielle par le colorant devrait, d'après la théorie de GIBBS (1), coïncider avec une faible fixation de Bordeaux. C'est ce que montre l'examen des nombres ci-dessus. En effet, la quantité de colorant fixée est de l'ordre de 2,5 milligrammes dans le cas de *B. caryocyaneus*, et de 38 milligrammes dans le cas d'*Endomyces albicans*, pour 144 milligrammes de colorant mis en œuvre.

Par contre, le sulfocyanure de potassium détermine une chute importante de la tension superficielle pour les suspensions d'*Endomyces albicans* comme pour les suspensions de *B. caryocyaneus*.

La solution tampon abaisse la tension superficielle, mais cette diminution est plus sensible avec *B. caryocyaneus* qu'avec *Endomyces albicans*.

Enfin, le mélange *suspension + solution* de $\text{pH} = 2,2 + \text{KSCN} + \text{colorant}$ offre une tension superficielle assez fortement abaissée, mais qui est du même ordre de grandeur avec les deux microorganismes. Donc, si l'on ne s'en tenait qu'aux variations de tension superficielle, le colorant devrait être sensiblement adsorbé en même quantité par le Champignon et par la Bactérie, sous réserve de surfaces adsorbantes de même valeur. L'expérience montre que, pour des systèmes : *suspension + solution tampon* de $\text{pH} = 2,2 + \text{KSCN} + \text{colorant}$, les quantités de colorant fixées sont respectivement de 118 milligrammes pour *B. caryocyaneus* et de 111 milligrammes pour *Endomyces albicans*.

Pour un partisan de la théorie physique (2), cette expérience paraît, en effet, établir que la nature de la membrane intervient peu dans la diffusion des substances à travers cette formation. Il faut bien se garder de conclusions aussi hâtives ; elles ne pourraient être soutenues avec quelque vraisemblance que si l'on comparait des mêmes surfaces actives chez les Bactéries et chez les Champignons. Or, rien n'est moins démontré. Les éléments d'*Endomyces albicans* et de *B. caryocya-*

(1) « GIBBS a montré en effet comme une nécessité thermodynamique que si une substance dissoute a la propriété d'abaisser la tension superficielle de la solution (à la surface de séparation de la solution et de l'air par exemple), cette substance existe à une concentration plus élevée dans la couche superficielle qu'au sein de la solution » (W.-M. LEWIS, *Traité de chimie physique*, p. 268, 1921).

(2) Loi de la pression osmotique.

Loi des concentrations : La pression osmotique varie, pour une même substance, proportionnellement à la concentration. (M. A. DASTRE, *Osmose in Traité de physique biologique*, T. I, 1901).

neus offrent évidemment des formes et des dimensions fort différentes. Sous ces réserves, reconnaissons que le volume des Champignons utilisé est sensiblement le double de celui des Bactéries expérimentées. Vraisemblablement, les surfaces actives ne sont pas les mêmes dans le cas d'*Endomyces albicans* et de *B. caryocyaneus*. Par conséquent, on n'est pas autorisé à conclure que la membrane du Champignon et celle de la Bactérie offrent la même perméabilité au colorant, ainsi que semblait le démontrer l'examen du tableau XXIII.

Dans l'interprétation des résultats, il faut tenir compte d'un autre facteur : c'est la variation du pH avec le système considéré. Avec les suspensions d'*Endomyces albicans*, le pH du système C passe de pH = 2,2 à pH = 2,94, tandis que pour *B. caryocyaneus*, le pH du mélange C homologue passe de pH = 2,2 à pH = 2,65.

Après avoir envisagé les variations de tension superficielle pour des suspensions réalisées avec des solutions tampons de pH = 2,2, il nous a semblé intéressant d'étudier les rapports qui peuvent exister entre la tension superficielle et le volume des corps microbiens, d'une part, la tension superficielle et la fixation du Bordeaux, d'autre part, en fonction du pH et du sulfocyanure de potassium. Dans ces essais, nous avons multiplié les points de la courbe en faisant croître le pH des solutions tampons de 0,5 en 0,5.

L'allure du phénomène, chez *B. caryocyaneus*, est schématisée dans les courbes ci-dessous :

Tension superficielle.

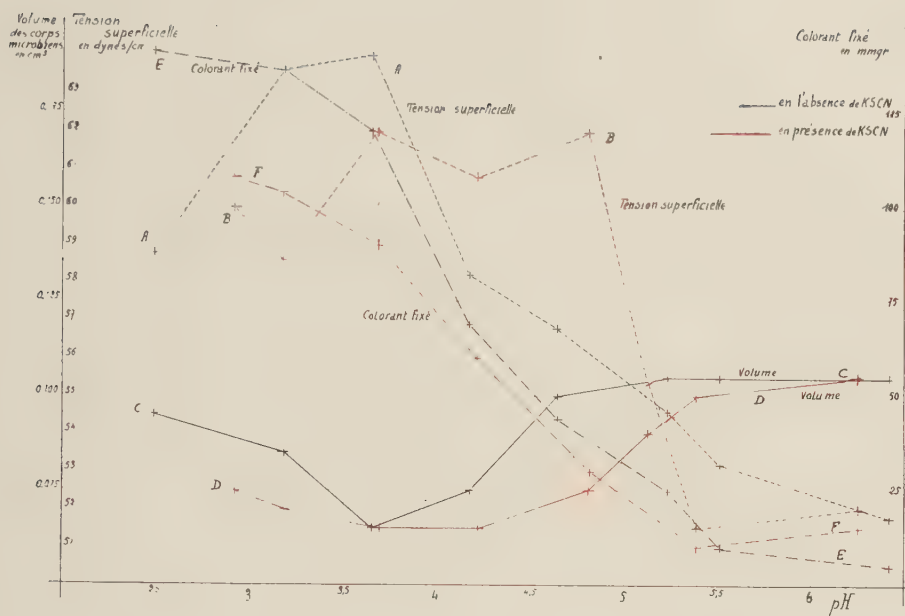
Cherchons s'il existe une relation entre la tension superficielle et le volume des Bactéries, d'une part, la tension superficielle et la quantité de colorant fixée, d'autre part.

Les courbes de tension superficielle (courbes A et B) sont des courbes en S.

En l'absence de sulfocyanure de potassium (courbe A), la tension superficielle croît de pH = 2,6 à pH = 3,6 environ, décroît rapidement de pH = 3,6 à pH = 5,5, puis lentement jusqu'à pH = 6,3.

Les systèmes additionnés de sulfocyanure de potassium montrent (courbe B) une tension superficielle plus élevée que celle des suspensions dépourvues de sulfocyanure de potassium, pour la zone des pH variant de pH = 4 à pH = 5. Dans la région des pH allant de pH = 2,2 à pH = 4 et de pH = 5 à pH = 6,3, la tension superficielle en présence de l'ion SCN⁻ est nettement plus faible qu'en l'absence de cet anion.

B. caryocyaneus



- A. — Tension superficielle en fonction du pH en l'absence de sulfocyanure de potassium.
- B. — Tension superficielle en fonction du pH en présence de sulfocyanure de potassium.
- C. — Volume des plastides en fonction du pH en l'absence de sulfocyanure de potassium.
- D. — Volume des plastides en fonction du pH en présence de sulfocyanure de potassium.
- E. — Fixation du colorant en fonction du pH en l'absence de sulfocyanure de potassium.
- F. — Fixation du colorant en fonction du pH en présence de sulfocyanure de potassium.

En première approximation, les tensions superficielles élevées correspondent aux minima de volume. Si l'on n'oublie pas « *qu'au point isoélectrique la tension superficielle de la particule colloïdale est maximum* » (LEWIS, 1921) (phénomène de LIPPMANN), on ne peut s'empêcher de rapprocher les faits que nous avons observés de ceux signalés par J. LOEB (1924). BARY pense que les faibles tensions superficielles permettent l'accès de l'eau par les espaces intermoléculaires. Par conséquent, elles facilitent le gonflement; c'est bien ce que nous observons : la zone des volumes élevés correspond aux basses tensions superficielles, celle des faibles volumes aux tensions superficielles élevées.

Si nous cherchons à établir une relation entre la tension superficielle et la fixation du colorant, nous sommes obligés de reconnaître que les hautes fixations de colorant correspondent à des tensions superficielles élevées et les faibles quantités de colorant fixées aux basses tensions superficielles. Ces faits ne paraissent pas être en harmonie avec la théorie de GIBBS.

Nous avons signalé, dans le chapitre III, l'influence de la composition de la solution tampon sur la fixation du colorant par les plastides de *B. caryocyanus* et sur le volume des corps microbiens.

Sous réserve de la variation de la concentration en électrolytes, on pourrait ramener ce phénomène à l'influence de l'anion.

Dans les lignes qui vont suivre, je voudrais insister sur les variations de tension superficielle en fonction de la nature de la solution tampon ajoutée aux différents systèmes.

Je rappelle le protocole d'expérience : des séries de tubes *a*, *b*, *c*,... (en verre résistant) reçoivent successivement la suspension microbienne, la solution colorante, la solution de sulfocyanure de potassium, la solution tampon et l'eau distillée, d'après l'ordre indiqué dans le tableau suivant :

TABLEAU XXIV

DÉSIGNA- TION des tubes	SUSPEN- SION microbienne	SOLUTION colorante	SOLUTION de KSCN 4N/1	SOLUTION tampon	EAU distillée
<i>a</i>	3 cm ³	3,6 cm ³	0	0	8,4 cm ³
<i>b</i>	3 cm ³	3,6 cm ³	3	0	5,4 cm ³
<i>c</i>	3 cm ³	3,6 cm ³	0	5,4	3 cm ³
<i>d</i>	3 cm ³	3,6 cm ³	3	5,4	0

On laisse toujours un temps de contact de trente minutes avant de déterminer la tension superficielle, le volume des corps microbiens et la quantité de colorant fixée.

Les résultats obtenus sont relatés dans le tableau XXV.

TABEAU XXV

Variation de volume des plastides de *B. caroycaneus*, variation de fixation du colorant

et de tension superficielle des suspensions microbiennes en fonction de la composition de la solution tampon.

DÉSIGNATION GNA- TION des tubes	<i>pH</i> des solutions tampons	COMPOSITION des solutions tampons	VOLUME DES PLASTIDES		QUANTITÉ DE COLORANT fixée exprimée en mmgr.		TENSION SUPERFICIELLE en dynes/cm. à 21° C	
			en l'absence de KSCN	en présence de KSCN	en l'absence de KSCN	en présence de KSCN	en l'absence de KSCN	en présence de KSCN
1 A.....	2,2	{ HCl + KCl	0,150 (0,100) (1)	0,150 (0,090-095)	42,5 (59,5)	51,5 (62,75)	62 (56,9)	50,7 (51,5)
2 B.....	2,2	{ Acide citrique + PO ₄ HN ₃ ²	0,125 (0,100)	0,100 (0,075)	132,2 (141)	112,5 (106,5)	66,7 (59)	63,7 (57,1)
3 Témoin eau distillée....			0,175 (0,105)	0,150 (0,095)	2,5 (5,5)	20,5 (48)	63 (66,9)	52,7 (53)

(1) Les nombres entre parenthèses correspondent à des valeurs obtenues dans d'autres expériences.

L'influence de la nature de la solution tampon peut être envisagée au point de vue du volume des plastides, de la quantité de colorant fixée et de la tension superficielle. Les deux premiers points de vue ont été exposés antérieurement (chapitre III), nous n'y reviendrons pas, et si nous faisons figurer dans le tableau ci-dessus les grandeurs relatives aux volumes des plastides et à la quantité de colorant fixée, c'est uniquement pour faciliter l'interprétation des résultats.

L'examen des 1^{re} et 9^e colonnes du tableau XXV montre le pouvoir tensioactif du sulfocyanure de potassium. L'addition de cet électrolyte aux différents systèmes abaisse toujours la tension superficielle. Cette chute varie évidemment avec l'expérience considérée, mais dans aucun cas la tension superficielle ne reste inchangée.

Pour un abaissement de tension superficielle de 10 dynes/cm. ou de 13 dynes/cm. environ (système 3), il y a une augmentation de la quantité de colorant fixée variant de 1 à 9. Dans cet exemple, l'abaissement de la tension superficielle correspond à une augmentation notable de la quantité de colorant fixée, fait conforme à la théorie de GIBBS.

Avec la solution tampon A (système 1), on observe des faits analogues.

La solution tampon B (système 2) se comporte de toute autre façon. Pour un abaissement de tension superficielle du même ordre que pour la solution tampon A, la quantité de colorant fixée décroît au lieu de croître.

La tension superficielle n'est donc pas le seul facteur qui conditionne la perméabilité de l'élément microbien étudié. Nous avons déjà vu, dans les expériences effectuées sur la culture des Bactéries qu'un même abaissement de tension superficielle par diverses substances tensioactives modifie de façon fort différente le tableau de la vie des Bactéries. Il y a là un phénomène dont l'étude reste à faire entièrement. Mais un point est acquis, il ne suffit pas de mentionner le pH du système expérimenté; à l'avenir, il faudra toujours préciser la composition de la solution tampon utilisée et c'est là le point nouveau sur lequel nous désirions attirer l'attention du Lecteur.

Certes, dans ce travail, je ne croyais pas pouvoir ramener le phénomène de BOAS à un schéma simplifié. J'espérais cependant éclaircir quelques points, notamment les variations de volume des corps microbiens sous l'influence du sulfocyanure de potassium et les variations de la perméabilité de certains microorganismes sous l'action de l'ion SCN—. Ces points, je pense

les avoir assez nettement mis en évidence ; mais je n'ai pu arriver, et cela je ne l'avais jamais envisagé, à donner une théorie générale du phénomène de BOAS. Les résultats partiels obtenus ne sont peut-être pas dénués de tout intérêt, car ils peuvent servir de point de départ à des recherches nouvelles. Je m'estimerai heureuse si j'ai pu apporter une contribution à l'œuvre poursuivie inlassablement par LASSEUR et ses Collaborateurs.

CONCLUSIONS GÉNÉRALES

1° L'étude du mécanisme du phénomène de BOAS ne peut pas être séparée de l'étude de la perméabilité de l'élément microbien.

2° La pénétration d'une substance dans l'élément microbien sous-entend la perméabilité de la membrane et du cytoplasme.

3° Différents savants, adoptant les vues de BUTSCHLI-ZETTNOW, ont contesté l'existence d'une membrane chez les Bactéries.

4° La présence d'une membrane chez les Bactéries nous paraît démontrée par l'examen ultramicroscopique et par l'emploi de colorants convenables.

5° La perméabilité cellulaire (cellules animales et cellules végétales) a suscité un nombre considérable de recherches. Les résultats obtenus ne sont certainement pas en rapport avec l'effort fourni dans cette voie. Cela tient peut-être à ce que le biologiste s'est contenté parfois d'analogies lointaines. En effet, les faits observés avec les membranes artificielles ne peuvent pas être transposés sans modifications dans le domaine des êtres vivants.

6° Contrairement au physicien, le biologiste ne peut pas faire abstraction de la notion de vie. Le fonctionnement physiologique des éléments microbiens varie avec l'espèce, la race et même l'individu considérés.

7° En microbiologie, on peut atténuer en partie l'influence individuelle en utilisant des cultures provenant de l'isolement d'une seule plasmide.

8° Parmi les nombreuses théories relatives au problème de la perméabilité de la membrane, nous citons :

a) *Théorie du volume moléculaire*. — La vitesse de pénétration d'une substance dépend du volume moléculaire et du diamètre des pores.

b) *Théorie des lipoides*. — La pénétration d'une substance B dans une cellule C dépend de la solubilité de B dans une couche lipoidique hypothétique L.

c) *Théorie de HAYNES*. — Les sels agissent sur la perméabilité par déplacement du pH des solutions tampons qui constituent les membranes.

d) *Théorie de TRAUBE*. — Si une membrane sépare deux liquides, le

liquide à tension superficielle la plus forte traverse la membrane. La différence de tension superficielle détermine la vitesse et la direction de l'osmose. Les substances à pression de fixation petite ont plus de chance de pénétrer dans la phase voisine que les substances à pression de fixation plus grande.

e) *Théorie de RUHLAND.* — La membrane fonctionne comme un tamis de molécules.

f) *Théorie de la différence de potentiel.* — MICHAELIS fait intervenir la charge électrique de la membrane et de la phase dispersée. Si les molécules traversent la membrane, il n'en est pas toujours de même pour les ions; seuls les ions possédant une charge de signe contraire au signe de la membrane peuvent traverser celle-ci.

Mais pour la majorité des auteurs, les membranes ne laissent passer que les ions de charge de même signe.

g) *Théorie de Pierre GIRARD.* — Pierre GIRARD considère la membrane comme un tamis, mais il fait intervenir les notions d'adsorption sélective et de polarisation de la paroi.

h) *Théorie des membranes complexes.* — La membrane serait constituée par une mosaïque de particules, les unes perméables aux cations et les autres perméables aux anions.

9° Aucune théorie ne donne une explication de tous les phénomènes observés.

10° La perméabilité des cellules animales et végétales est sous la dépendance de nombreux facteurs, parmi lesquels nous notons: le volume moléculaire, la charge électrique, la réaction du milieu, la tension superficielle, l'influence des électrolytes (sur la pénétration des colorants, sur la pénétration des électrolytes), l'équilibre de DONNAN, la dissociation électrolytique, le coefficient de température, l'action des courants électriques, des narcotiques, la composition du milieu nutritif, l'altération de la membrane, l'influence de l'espèce, de la race, de l'individu, de l'âge de cet individu, etc.

11° Le problème de la perméabilité apparaît de plus en plus complexe et, dans l'état actuel de la Science, la Chimie physique est incapable, à elle seule, d'expliquer tous les processus biologiques (GUYE, LECOMTE DU NOUY).

12° Dans une culture mixte *Bactéries + Champignons*, l'action sélective de l'ion SCN—, telle qu'elle a été décrite par BOAS, est incontestable.

13° Dans mes expériences, comme dans celles de LASSEUR, DUPAIX et

OLIVIER (1931), les plastides de *B. caryocyanus* présentent un minimum de volume aux environs de $\text{pH} = 3,6$.

14° De $\text{pH} = 2,2$ à $\text{pH} = 8$, l'addition de sulfocyanure de potassium aux systèmes détermine une contraction du volume des corps microbiens de *B. caryocyanus*, sauf pour $\text{pH} = 7$, où le volume des plastides est le même en présence et en l'absence de sulfocyanure de potassium.

La courbe de volume des plastides de *B. caryocyanus* en présence de l'ion SCN^- offre son minimum à $\text{pH} = 3,3$.

15° Dans les systèmes dépourvus de sulfocyanure de potassium, la quantité de Bordeaux B fixée par *B. caryocyanus* décroît de $\text{pH} = 2,2$ à $\text{pH} = 8$.

16° L'addition de sulfocyanure de potassium diminue la perméabilité des plastides de *B. caryocyanus* pour le Bordeaux B de $\text{pH} = 2,2$ à $\text{pH} = 8$.

17° En l'absence de sulfocyanure de potassium, *Endomyces albicans* comme *B. caryocyanus* offre un minimum de volume entre $\text{pH} = 3,3$ et $\text{pH} = 3,6$.

On note un second minimum de volume à $\text{pH} = 6,3$.

18° Le sulfocyanure de potassium détermine une contraction des cellules d'*Endomyces albicans* de $\text{pH} = 2,2$ à $\text{pH} = 8$. L'intensité de la contraction est plus grande chez le Champignon que chez la Bactérie. Le maximum s'observe à $\text{pH} = 3,44$. Le minimum de volume que l'on obtenait à $\text{pH} = 6,3$ en l'absence de sulfocyanure de potassium disparaît par addition de cet électrolyte.

19° La quantité de Bordeaux B fixée par *Endomyces albicans* décroît de $\text{pH} = 2,2$ à $\text{pH} = 8$.

20° Dans la zone des pH allant de $\text{pH} = 2,2$ à $\text{pH} = 5$, l'ion SCN^- augmente la fixation du colorant par les cellules d'*Endomyces albicans*, contrairement à ce que l'on observe avec *B. caryocyanus*.

21° À $\text{pH} = 2,2$, les solutions tampons de MAC ILVAINE (acide citrique + phosphate de soude) et de CLARK et LUBS (phthalate acide de potassium + acide chlorhydrique) déterminent la même contraction de volume des plastides de *B. caryocyanus*. La solution tampon de CLARK et LUBS (chlorure de potassium + acide chlorhydrique) provoque une diminution plus faible du volume que les deux autres solutions, bien que, dans les deux cas, la concentration en ions H^+ soit la même. On observe des faits analogues quand on ajoute du sulfocyanure de potassium aux trois systèmes.

22° Cette influence de la composition de la solution tampon se retrouve encore dans la fixation du colorant : les deux premières solutions se comportent de façon identique, mais différemment de la troisième.

23° Pour un pH donné, le volume des plastides de *B. caryocyaneus* et la fixation du colorant par les mêmes éléments varient avec la composition de la solution tampon utilisée. Ces résultats confirment les faits décrits par LASSEUR, DUPAIX, OLIVIER (1931); LASSEUR, DUPAIX, GROJEAN (1932).

24° Les Champignons sont peu ou pas sensibles à l'action des ions OH—. Il en est de même pour les Bactéries « *prenant le GRAM* ».

25° Par contre, les Bactéries « *ne prenant pas le GRAM* » sont sensibles à l'action des ions OH—. Certaines suspensions offrent un éclaircissement instantané à pH = 12 (*B. caryocyaneus*, *B. pyocyaneus*). Ces faits confirment les observations antérieures de LASSEUR, DUPAIX et OLIVIER (1931).

26° Il y a un parallélisme entre l'aptitude du Staphylocoque (souche HAUDUROY) à la lyse par le Bactériophage homologue et sa sensibilité aux ions OH—.

27° Nous ne retrouvons pas ce parallélisme avec le Colibacille. En effet, l'opacité des suspensions de Colibacille lysable (souche HAUDUROY) n'est pas plus diminuée par les ions OH— que celle des suspensions de Colibacille non lysable.

28° L'addition de chlorure de sodium à des suspensions effectuées dans l'eau distillée détermine une diminution de volume des plastides de *B. caryocyaneus*. Mais la contraction ne croît pas avec la concentration des systèmes en chlorure de sodium.

29° Que les suspensions soient effectuées dans l'eau distillée ou dans l'eau distillée additionnée de 9 à 18 grammes 0/00 de chlorure de sodium, le sulfocyanure de potassium provoque sensiblement la même contraction.

Il n'en est pas de même quand la concentration en chlorure de sodium atteint 36-39 grammes 0/00. Dans ce cas le sulfocyanure de potassium détermine un gonflement des plastides de *B. caryocyaneus*.

30° La variation de concentration des systèmes en corps microbiens ne modifie pas notablement l'allure du phénomène.

31° L'addition de chlorure de lithium ou de chlorure de magnésium ou de chlorure de calcium à l'eau distillée provoque une contraction de volume des plastides de *B. caryocyaneus*, dans le sens de la série suivante :

Na < Ca < Mg, Li, série différente de celle d'HOFMEISTER.

Le chlorure de lithium et le chlorure de magnésium se comportent sensiblement de la même façon.

32° Le sulfocyanure de potassium semble modifier irrégulièrement la perméabilité de la membrane quand il est en présence d'un chlorure autre que le chlorure de sodium.

33° La présence de chlorure alcalin dans les systèmes favorise la pénétration du Bordeaux B dans le sens de la série suivante :

$\text{Li} < \text{Na} < \text{Mg} < \text{Ca}$. Nous ne retrouvons pas là non plus la rangée d'HOFMEISTER. Seule, la position de Li par rapport à Na est analogue à celle que signale HÖBER pour des solutions d'albumine.

34° L'addition de sulfocyanure de potassium à la solution de chlorure augmente encore la fixation du colorant par les plastides bactériennes. Dans ces expériences, on obtient sensiblement la série d'HOFMEISTER : $\text{Na}, \text{Li} < \text{Mg} < \text{Ca}$.

35° La présence d'une substance tensioactive (glycocholate, taurocholate de soude) dans un milieu nutritif (liquide L_1 de LASSEUR, solution peptonée) provoque des troubles importants dans la vie des Bactéries.

36° Ces perturbations sont temporaires ou permanentes. Elles affectent soit la forme, soit la multiplication, soit le pouvoir chromogène des éléments microbiens.

37° Les diverses espèces bactériennes réagissent différemment aux substances tensioactives.

38° Les espèces sporogènes sont particulièrement sensibles à l'action du glycocholate et du taurocholate de soude.

39° L'action des substances tensioactives varie avec la nature du milieu nutritif utilisé.

40° Pour un même abaissement de tension superficielle, le taurocholate et le glycocholate de soude ne se comportent pas de la même façon vis-à-vis des Bactéries expérimentées.

41° Le sulfocyanure de potassium provoque une chute importante de la tension superficielle des suspensions d'*Endomyces albicans* et de *B. caryocyaneus* effectuées dans l'eau distillée.

42° La solution tampon de $\text{pH} = 2,2$ (acide citrique + phosphate) abaisse la tension superficielle des suspensions d'*Endomyces albicans* et de *B. caryocyaneus*.

43° Lorsqu'on fait varier la concentration en ions H^+ des systèmes : *suspension + sulfocyanure de potassium*, on détermine un abaissement de la tension superficielle pour la zone des pH allant de $pH = 2,2$ à $pH = 4$ et de $pH = 5$ à $pH = 6,3$.

44° Les tensions superficielles élevées correspondent aux minima de volume, les tensions superficielles basses aux maxima de volume.

45° Les fortes fixations de colorant coïncident avec des tensions superficielles élevées et les faibles fixations avec de basses tensions superficielles.

46° Pour un pH donné, la nature de la solution tampon influe sur la tension superficielle.

47° Les résultats obtenus ne permettent pas de relier à la tension superficielle les modifications de perméabilité que nous avons observées.



BIBLIOGRAPHIE

- W.-R. ALBUS. — *Effect of surface tension on the growth of Escherichia Coli.* (*Journ. of infect. Diseases*, Vol. 41, pp. 211-214, 1927).
- K.-J. ANSELMINO. — *Untersuchungen ueber der Durchlässigkeit künstlicher kolloidaler Membranen.* (*Biochem. Zeitschr.*, Bd. 192, p. 390, 1927).
- W. ARCISZEWSKI, E. CZARNECKI, W. KOPACZEWSKI et W. SZUKIEWICZ. — *Etude sur les phénomènes électrocapillaires. IV. Rôle des facteurs physiques.* (*Protoplasma*, T. III, n° 3, pp. 345-356, 1928).
- S. Henry AYERS, P. RUPP et W. JOHNSON. — *The influence of surface tension depressants on the growth of Streptococci. VI. Studies of Streptococci* (*Journ. of infect. Diseases*, T. 33, pp. 202-216, 1923).
- P. BARY. — *Les Colloïdes* (DUNOD, Paris, 508 pages, 1921).
- H. BECHHOLD. — *Silberkohle und Silberbolus* (*Münch. med. Wochenschr.*, Nr. 36, pp. 1149-1151, 1923).
- H. BECHHOLD. — *Chlorosilber-Kieselsäure* (*Münch. med. Wochenschr.*, Nr. 39, pp. 1625-1626, 1925).
- H. BECHHOLD. — *Keimsichere Filter* (*Gesundheits-Ingenieur*, Heft 9, 1926).
- H. BECHHOLD. — *Zehn Jahre Institut für Kolloidforschung zu Frankfurt a. Main* (Frankfurt am Main, 1927).
- H. BECHHOLD et L. KEINER. — *Vorfragen der Adsorptionstherapie* (*Zeitschr. f. die gesamte exp. Medizin*, Bd LVI, Heft 5/6, pp. 543-562, 1927).
- H. BECHHOLD et W. KRAUS. — *Kolloidstudien ueber den Bau der roten Blutkörperchen und ueber Hämolyse. I. Sublimathärtung und Sublimathämolyse* (*Biochem. Zeitschr.*, Bd. 109, pp. 226-235, 1920).
- H. BECHHOLD. — *Allgemeines ueber Kolloide.* (*Handbuch der pathogenen Mikroorganismen*, Auflage 3, Herausgegeben von W. KOLLE, R. KRAUS und P. UHLENHUTH, Bd. I, 2, pp. 663-1334 et 1009-1026, 1929).
- H. BEGUET. — *Hypothèses sur le rôle de la pression osmotique dans les phénomènes microbiens. I. Phénomène de d'HERELLE. II. Variation et mutations des types microbiens.* (*Arch. de l'Inst. Pasteur d'Algérie*, T. V, fasc. I, pp. 25-31, 1927).
- F. BENOIST, V. GOLBLIN et W. KOPACZEWSKI. — *Etudes sur les phénomènes électrocapillaires. VIII. Coloration vitale.* (*Protoplasma*, T. V, n° 4, pp. 481-510, 1929).
- L. BERCEZELLER. — *Stalagmometrische Studien an krystalloiden und kolloiden Lösungen.*
V. *Die Beziehung zwischen physiologischer und physikalisch-chemischer Wirkung der Neutralsalze.* (*Biochem. Zeitschr.*, Bd. 66, pp. 173-190, 1914).
VI. *Ueber die Wirkung von Phenol auf die Oberflächenspannung von Eiweißlösungen.* (*Biochem. Zeitschr.*, Bd. 66, pp. 191-201, 1914).
VII. *Pharmakologische Wirksamkeit und Oberflächenspannungserniedrigung.* (*Biochem. Zeitschr.*, Bd. 66, pp. 202-206, 1914).

- VIII. Ueber einige Komplexe von Eiweiss und Stärke mit anderen Kolloiden. (Biochem. Zeitschr., Bd. 66, pp. 207-217, 1914).
- IX. Ueber kolloide Komplexe des Cholesterins. (Biochem. Zeitschr., Bd. 66, pp. 218-224, 1914).
- X. Ueber die Einwirkung einiger Narkotica auf Lecithinlösungen. (Biochem. Zeitschr., Bd. 66, pp. 225-230, 1914).
- G. BERTRAND et M. ROSEN BAND. — *Recherches sur l'action paralysante exercée par certains acides sur la peroxydiastase.* (Ann. Inst. Past., T. XXIII, n° 4, pp. 314-320, 1909).
- G. BERTRAND et M. et M^{me} ROZENBLATT. — *Recherches sur l'hydrolyse comparée du saccharose par divers acides en présence de la sucrase de Levûre.* (Ann. Inst. Past., T. XXVI, pp. 321-331, 1912).
- G. BERTRAND et M. et M^{me} ROZENBLATT. — *Recherches sur l'hydrolyse comparée du saccharose par divers acides en présence de la sucrase d'Aspergillus.* (Ann. Inst. Past., T. 26, pp. 931-936, 1912).
- G. BERTRAND et M. et M^{me} ROZENBLATT. — *Recherches sur l'hydrolyse comparée du saccharose par divers acides en présence de la sucrase de Kôji.* (Ann. Inst. Past., T. 27, pp. 366-372, 1913).
- A. BETHE. — *Der Einfluss der H-Ionenkonzentration auf die Permeabilität toter Membranen, auf die Adsorption an Eiweisskolloiden und auf den Stoffaustausch der Zellen und Gewebe.* (Biochem. Zeitschr., Bd. 127, p. 18, 1922).
- E.-J. BIGWOOD. — *De la perméabilité de la gelée de gélatine au chlorure de calcium. La perméabilité sélective en l'absence de membrane.* (C. R. Soc. Biol., T. 96, p. 131, 1927).
- F. BOAS. — *Untersuchungen ueber Säurewirkung und Bildung löslicher Stärke bei Schimmelpilzen. (Aspergillus niger)* (Beihefte z. Botan. Centralbl., Bd. XXXVI, 1 Abt, 1919).
- F. BOAS. — *Beiträge zur Hylergographie. Ueber die Wirkung von Salzen, namentlich Neutralsalzen auf die Zelle.* (Biochem. Zeitschr., Bd. 176, p. 349, 1926).
- F. BOAS. — *Von phyletischen Ionenphänomen und seiner Anwendung in der landwirtschaftlichen Mikrobiologie.* (Fortschr. der Landwirtsch., Heft 4, 1928).
- F. BOAS. — *L'anion-phénomène phylétique.* (FISCHER, Jena, 1927, traduit de l'allemand par C.-J. KOENIG, Vigot, Paris, 99 pages, 1931).
- F. BOAS. — *Versuche zu einer Zelldifferenzierungslehre.* (Deutsch. botan. Gesellsch., Bd. L, Heft 8, pp. 376-382, 1932).
- F. BOAS et G. NEUMULLER. — *Zur Kenntnis von Gallensalzwirkungen auf einige Gärungsorganismen.* (Archiv f. Mikrobiol., Bd 1, Heft I, 1930).
- J. BOESEKEN et H. J. WATERMAN. — *Die Protoplasmawand und die Bedeutung der Oberflächenspannung bei der Wirkung der wasserlöslichen Stoffe auf den Organismus.* (Kolloid-Zeitschr., Bd. 11, p. 58, 1912).
- Robert-Hermann BOGUE. — *Traité de Chimie colloïdale* (Traduction J. BARBAUDY, Hermann et C^{ie}, Paris, 438 pages, 1928).
- A. BOUTARIC. — *Les Colloïdes et l'état colloïdal.* (ALCAN, Paris, 258 pages, 1931).

- A. BOUTARIC et J. BOUCHARD. — *Sur la floculation des sols d'hydrate ferrique par divers électrolytes et la loi de SCHULZE-HARDY*. (Journ. de Chimie-Physique, T. 29, n° 1, 1932).
- A. BOUTARIC et M. DOLADILHE. — *Sur quelques lois relatives à la fixation des matières colorantes par les racines et les feuilles des Végétaux*. (C. R. Soc. Biol., T. CVII, p. 1039, 1931).
- H. BRUHL. — *Untersuchungen zur Membran und Eiweisswirkung des Cofeins*. (Biochem. Zeitschr., Bd. 212, Heft 4 et 6, p. 291, 1929).
- E.-F. BURTON. — *The physical properties of colloidal solutions*. (Longmans, Green et C^{ie}, Londres, 221 pages, 1921).
- M. CHANOS. — *Dissolution de sulfate de cuivre et colorabilité de quelques membranes animales. Le point de neutralité fonctionnelle*. (C. R. Soc. Biol., T. 97, p. 1539, 1927).
- M. CHANOS et R. NOEL. — *Sur le gonflement en fonction du pH des membranes organisées*. (C. R. Soc. Biol., T. 99, p. 67, 1928).
- W.-M. CLARK. — *The determination of hydrogen ions* (Williams et Wilkins Company, 480 pages, 1923).
- R. COLLANDER. — *Ueber die Permeabilität von Kolloidiummembranen*. (Soc. Sc. Fennica Comm. Biol., T. II, n° 6, 1926).
- Conférences faites au Laboratoire de Microbiologie : DARMOIS, DUFOUR, TRAVERS, VAVON, PIERRET, COLLIN, GUINIER, GAIN, NÈGRE, PATRIAT, VITU (Fasc. I, 1930); LECOMTE DU NOUY (Fasc. II, 1931); METALNIKOV (Fasc. III, 1931); BOUTARIC (Fasc. IV, 1931); MAGROU (Fasc. V, 1932).
- G. DALMA. — *Sur le passage de l'Ion-Brome du sérum dans le liquide céphalo-rachidien à travers une membrane semi-perméable*. (C. R. Soc. Biol., T. 97, p. 1206, 1927).
- M.-A. DASHER. — *Traité de physique biologique*. (T. I, Masson et C^{ie}, Paris, 1901).
- A.-A. DAY et W.-M. GIBBS. — *Surface tension in relation to bacterial Growth*. (Journ. on inf. Diseases, Vol. 43, pp. 97-107, 1928).
- M. DOLADILHE. — *Contribution à l'étude de la fixation des matières colorantes sur les granules colloïdaux et les fibres textiles*. (Thèse Doctorat ès-Sciences physiques, Dijon, 1931).
- M.-F.-G. DONNAN. — *Théorie thermodynamique de quelques équilibres au contact de membranes semi-perméables*. (Rapports et discussions sur des questions d'actualité, Institut international de Chimie Solvay, Troisième Conseil de Chimie, pp. 241-255, 1928).
- E. DOUMER et Edmond DOUMER. — *Loi de l'abaissement de la tension superficielle de l'eau distillée par le glycocholate de soude*. (C. R. Soc. Biol., T. 84, p. 393, 1921).
- E. DOUMER et Edmond DOUMER. — *Action du chlorure de sodium sur la tension superficielle des dissolutions aqueuses de glycocholate de soude*. (C. R. Soc. Biol., T. 84, p. 595, 1921).
- E. DOUMER et Edmond DOUMER. — *Tension superficielle des solutions de chlorure de sodium dans l'eau distillée*. (C. R. Soc. Biol., T. 84, p. 681, 1921).

- E. DOUMER et Edmond DOUMER. — *Action secondaire des fortes concentrations de chlorure de sodium sur la tension superficielle des solutions de glycocholate de soude.* (C. R. Soc. Biol., T. 84, p. 683, 1921).
- R. DUBRISAY. — *Applications de la mesure des tensions superficielles à l'analyse chimique.* (Mémorial des Sciences physiques, Fasc. VIII, 1929).
- J. DUCLAUX. — *Les Colloïdes* (GAUTHIER-VILLARS, 288 pages, 1920).
- M. DUVAL. — *Tension superficielle et volume globulaire.* (C. R. Soc. Biol., T. XCV, pp. 1330-1332, 1926).
- B. EPIRUSSI. — *La réaction à la fécondation des œufs d'Oursin chauffés.* (C. R. Soc. Biol., T. 93, p. 1561, 1925).
- W. ESTOR. — *Quantitative Untersuchungen ueber die Beziehungen zwischen dem Wachstum von Bakterien und Pilzen und der Konzentration einiger Neutralsalze.* (Centralbl. f. Bakt., Bd. 72, pp. 411-443, 1927).
- Ph. FABRE. — *Leçons de physico-chimie.* (Masson et C^{ie}, Paris, 1930).
- Martin H. FISCHER. — *The Colloid-chemical theory of water absorption by Protoplasm.* (Journ. of the amer. Med. Assoc., Vol. LX, pp. 348-350, 1913).
- Martin-H. FISCHER. — *On hydration and « Solution » in gelatin.* (Journ. f. Science, Vol. XLII, n° 1076, pp. 223-236, 1915).
- Martin-H. FISCHER. — *The principes of Treatment in Nephritis.* (Abst. of the stenog. report of remarks at the Tennessee State Med. Assoc. meeting in Knoxville, Avril 1916).
- Martin-H. FISCHER. — *On the electrical resistance of phenol water systems and of protoplasm.* (Journ. f. Science, Vol. LVII, n° 1486, pp. 724-727, 1923).
- Martin-H. FISCHER. — *Die kolloidchemische Theorie der Wasserbindung in Organismus.* (Kolloid-Zeitschr., Bd. XXXV, Heft 5, pp. 294-302, 1924).
- Martin-H. FISCHER et R.-W. BLEDSOE. — *A harmless mucous membrane irrigant.* (Journ. of the amer. med. Assoc., Vol. 88, pp. 1881-1882, 1927).
- Martin-H. FISCHER et M. HOOKER. — *Ternary systems and the behavior of protoplasm.* (Science N. S., Vol XLVIII, n° 1232, pp. 143-148, 1918).
- Martin-H. FISCHER et M. HOOKER. — *Ueber der elektrischen Widerstand konzentrierter Schwefelsäure und die Theorie der Hydratation von Kolloiden.* (Kolloid-Zeitschr., Bd. 40, Heft 4, pp. 303-305, 1926).
- Martin-H. FISCHER und Marian-O. HOOKER. — *Ueber einige Kaseinate und die Theorie der lyophilen Kolloide.* (Kolloid-Zeitschr., Bd. 47, Heft 3, pp. 193-206, 1929).
- Martin-H. FISCHER, M.-D. and Georges D. MC. LAUGHLIN. — *A third model illustrating some phases of kidney secretion.* (Journ. of laboratory and clinical Med., Vol. V, n° 6, 1920).
- G. FONTES et L. THIVOLLE. — *La perméabilité des hématies aux glucides plasmatiques.* (C. R. Soc. biol., T. 100, p. 1198, 1929).
- J. FORSMANN, Th. WADSTEIN et G. FISCHER. — *Der Einfluss verschiedener Salzkonzentrationen auf die Hämagglutination.* (Acta pathol. et microbiol-Scandinavica, Vol. VII, Fasc. 3, pp. 205-237, 1930).
- M. FROBISCHER. — *Studies upon the relationship between surface tension and the action of disinfectants, with special reference to hexylresorcinol.* (Journ. Bact., Vol. 13, pp. 163-182, 1927).
- E. GELLHORN. — *Das Permeabilitätsproblem.* (Julius Springer, Berlin, 1929).

- L. GEORGES. — *Observations sur le mécanisme du phénomène de BOAS.* (Bull. de l'Assoc. des Diplômés de Microbiol. de la Fac. de Pharm. de Nancy, n° 5, pp. 12-20, 1932).
- P. GIRARD. — *Mécanisme électrostatique de l'hémiperméabilité des tissus vivants aux électrolytes.* (C. R. Acad. Sciences, T. 150, p. 1146, 1910).
- P. GIRARD. — *La pression osmotique et le mécanisme de l'osmose.* (Publications de la Société de Chimie-physique, III, 1912).
- P. GIRARD. — *Essai d'un schéma physique de l'hémiperméabilité des cellules vivantes aux ions.* (C. R. Acad. Sciences, T. 159, p. 376, 1914).
- P. GIRARD. — *A propos de l'action des sels de terres rares sur les cellules microbiennes.* (C. R. Soc. Biol., T. 84, pp. 442-443, 1921).
- P. GIRARD. — *La perméabilité sélective des parois vivantes et inertes aux ions et les conséquences chimiques qu'elle comporte.* (Ann. de Physiol., T. 1, p. 194, 1925).
- P. GIRARD. — *La perméabilité sélective des membranes. Ses effets physiques et chimiques. (Rapports et discussions sur des questions d'actualité. Institut international de Chimie SOLVAY, Troisième Conseil de Chimie, pp. 259-297, 1928).*
- P. GIRARD et R. AUDUBERT. — *Les charges électriques des microbes et leur tension superficielle.* (C. R. Acad. Sciences, T. 167, p. 351, 1918).
- P. GIRARD et W. MESTREZAT. — *Recherches expérimentales sur la perméabilité des cellules aux ions. Schéma physico-chimique de la perméabilité sélective.* (C. R. Soc. Biol., T. 87, p. 356, 1922).
- P. GIRARD et W. MESTREZAT. — *Origine de l'acidité gastrique. Formation d'acide chlorhydrique par dialyse élective de la solution d'un chlorure neutre.* (C. R. Soc. Biol., T. 95, p. 638, 1926).
- P. GIRARD, W. MESTREZAT et V. MORAX. — *Recherches expérimentales sur la perméabilité des tissus vivants aux ions.* (C. R. Soc. Biol., T. 87, p. 69, 1922).
- P. GIRARD, W. MESTREZAT et V. MORAX. — *Recherches expérimentales sur la perméabilité cellulaire. Perméabilité de la cornée de l'œil vivant.* (C. R. Soc. Biol., T. 87, p. 144, 1922).
- P. GIRARD, W. MESTREZAT et V. MORAX. — *Recherches expérimentales sur la perméabilité cellulaire aux ions. La perméabilité de la cornée est une perméabilité ionique élective.* (C. R. Soc. Biol., T. 87, p. 227, 1922).
- R. GOIFFON. — *Nouveau procédé de mesure de tension superficielle.* (C. R. Soc. Biol., T. XCIII, pp. 1498-1501, 1925).
- E. GRATZY et F. WEBER. — *Plasmolyse Ort und Membranwachstum.* (Protoplasma, Bd. 12, Heft 4, p. 559, 1931).
- C.-E. GUYE. — *L'évolution physico-chimique.* (Chiron, Paris, 112 pages, 1922).
- D. HAYNES. — *The action of salts and non-electrolytes upon buffer solutions and amphoteric electrolytes and the relation of these effects to the permeability of cell.* (Biochem. J., Vol. 15, p. 440, 1921).
- R. HÖBER. — *Physikalische Chemie der Zelle und der Gewebe* (Wilhelm Engelmann, Leipzig, 1922).
- R. HÖBER. — *The first Reynold A. SPAETH memorial lecture, The present conception of the structure of the Plasma-Membrane.* (Biol. Bull., Vol. 58, n° 1, 1930).

- R. HÖBER. — *Ueber die Hemmung der Farbstoffkonzentrierung in der Leber durch organische Nichtleiter und organische Salze.* (Pflüg. Archiv. Bd. 229, Heft 3, 1932).
- R. HÖBER et G. PUPILLI. — *Neue Versuche ueber die Aufnahme von Farbstoffen durch die roten Blutkörperchen.* (Pflüg. Archiv., Bd. 226, Heft 4 et 5, 1931).
- F. HOFMEISTER. — *Zur Lehre von der Wirkung der Salze.* (Arch. f. exper. Path., Bd. 25, p. 1, 1888; Bd. 28, p. 210, 1891).
- A.-Ch. HOLLANDE et G. CRÉMIEUX. — *Le pouvoir toxique des matières colorantes d'aniline vis-à-vis des Microbes.* (C. R. Soc. Biol., T. XCIX, p. 542, 1928).
- W. HOLOBUT. — *Les changements de perméabilité des membranes cellulaires du muscle et leurs effets biologiques.* (C. R. Soc. Biol., T. C, p. 1232, 1929).
- M. IRWIN. — *The permeability of living cells to dyes as affected by hydrogen ion concentration.* (Journ. gen. Physiol., T. 5, p. 223, 1922).
- G. KATTERMANN. — *Ueber Neutralsalzwirkungen bei Pilzen und Bakterien. Ein Beitrag zum phyletischen Ionenphänomen.* (Botan. Archiv., Bd. 28, Heft 1/2, 1930).
- B. KISCH. — *Ueber die Oberflächenspannung der lebenden Plasmahaut bei Hefe und Schimmelpilzen.* (Biochem. Zeitschr., Bd. 40, p. 152, 1912).
- C.-J. KOENIG. — *Otite mycotique. La physico-chimie de l'antisepsie.* (Soc. d'Oto-rhino-laryngologie de Paris, 1929).
- W. KOPACZEWSKI. — *Einfluss der Säuren auf die Hydrolyse der Maltose durch Maltese.* (Thèse Doctorat Sciences, Fribourg, Suisse, 1911).
- W. KOPACZEWSKI. — *Die Affinitätsreihe und die biologische Wirksamkeit der Säuren.* (Dermat. Zeitschr. physik. chem. Biol., T. I, pp. 420-430, 1914).
- W. KOPACZEWSKI. — *L'influence des acides sur l'activité de la maltase dialysée.* (Ann. Inst. Past., T. XXIX, n° 3, p. 157-163, 1915).
- W. KOPACZEWSKI. — *La tension superficielle en biologie. I. La tension superficielle et sa mesure; un nouveau tonomètre.* (Archiv. de Phys. biol., T. I, n° 4, 1921).
- W. KOPACZEWSKI. — *La tension superficielle en biologie. II. Le rôle de la tension superficielle dans les phénomènes de choc par contact.* (Archiv. de Phys. biol., T. II, n° 2, 1922).
- W. KOPACZEWSKI. — *La tension superficielle en biologie. III. Le rôle de la tension superficielle dans la réaction de BORDET-WASSERMANN.* (Archiv. de Phys. biol., T. II, n° 3, 1922).
- W. KOPACZEWSKI. — *Les colloïdes et la vie.* (Revue génér. des Sciences, n° 12, pp. 358-364, 1922).
- W. KOPACZEWSKI. — *La chimie et l'état colloïdal. A propos d'un livre récent de J. LOEB.* (Revue génér. des Sciences, n° 21, pp. 610-619, 1922).
- W. KOPACZEWSKI. — *Tension superficielle en Biologie.* (C. R. Soc. Biol., T. XCI, pp. 402-404, 1924).
- W. KOPACZEWSKI. — *L'état colloïdal et la vie* (Revista de Quim. pura e aplicada, n° 3, 1928).

- W. KOPACZEWSKI. — *Conditions chimiques de la vitalité microbienne.* (Archiv. f. Mikrobiologie., Bd. 2, Heft 2, 1931).
- W. KOPACZEWSKI. — *Biocolloïdologie. Principaux résultats. Problèmes à résoudre.* (Protoplasma, T. XIV, n° 2, pp. 256-295, 1931).
- W. KOPACZEWSKI. — *Point isoélectrique ou zones de labilité colloïdales.* (Protoplasma, T. XIII, n° 2, pp. 405-420, 1931).
- W. KOPACZEWSKI et M. ROSNOWSKI. — *Etude sur les phénomènes électrocapillaires. V. Rôle des ions.* (Protoplasma, T. V, n° 1, pp. 14-34, 1928).
- J. KRIZENECKI et O. DUBSKA. — *Nouvelle méthode pour la mesure de la tension superficielle des liquides biologiques.* (C. R. Soc. Biol., T. XCVI, pp. 1430-1432, 1927).
- J. KRIZENECKI et O. DUBSKA. — *Relation entre la tension superficielle des liquides biologiques dans l'air et dans un milieu analogue au protoplasme.* (C. R. Soc. Biol., T. XCVII, pp. 1765-1768, 1927).
- Ph. LASSEUR. — *Contribution à l'étude de B. chlororaphis G. et S.* (Thèse Doctorat Sciences naturelles, Berger-Levrault, Nancy, 1911).
- Ph. LASSEUR, P. DOMBRAY et M. MOREL. — *Etude sur le mécanisme du phénomène de Boas.* (Travaux du Laboratoire de Microbiologie, Fac. de Pharmacie, Nancy, Fasc. IV, pp. 99-119, 1931).
- Ph. LASSEUR, A. DUPAIX et L. GEORGES. — *Remarques sur le phénomène de Boas.* (C. R. Acad. des Sciences, T. 194, n° 21, p. 1857, 1932).
- Ph. LASSEUR, A. DUPAIX et L. GEORGES. — *Observations sur le problème de la perméabilité.* (Travaux du Laboratoire de Microbiologie, Fac. de Pharmacie, Nancy, Fasc. V, pp. 57-82, 1932).
- Ph. LASSEUR, A. DUPAIX et L. GEORGES. — *Observations sur le mécanisme du phénomène de Boas.* (Travaux du Laboratoire de Microbiologie, Fac. de Pharmacie, Nancy, Fasc. V, pp. 83-94, 1932).
- Ph. LASSEUR, A. DUPAIX et L. GEORGES. — *Influence de la composition de la solution tampon. Rôle de l'anion.* (Travaux du Laboratoire de Microbiologie, Fac. de Pharmacie, Nancy, Fasc. V, pp. 95-98, 1932).
- Ph. LASSEUR, A. DUPAIX et L. GEORGES. — *Influence des électrolytes sur les variations de volume des corps microbiens déterminées par le sulfocyanure de potassium.* (Travaux du Laboratoire de Microbiologie, Fac. de Pharmacie, Nancy, Fasc. V, pp. 99-104, 1932).
- Ph. LASSEUR, A. DUPAIX et L. GEORGES. — *Action des ions OH— sur les suspensions microbiennes.* (Travaux du Laboratoire de Microbiologie, Fac. de Pharmacie, Nancy, Fasc. V, pp. 105-109, 1932).
- Ph. LASSEUR, A. DUPAIX et M. OLIVIER. — *Phénomène de CHARRIN et ROGER; I. Action du pH sur la marche de l'agglutination. II. Action du pH sur le volume des plastides bactériennes. III. Protection. Phénomène paradoxal.* (Travaux du Laboratoire de Microbiologie, Fac. de Pharmacie, Nancy, Fasc. IV, pp. 139-210, 1931).
- Ph. LASSEUR, P. VERNIER, A. DUPAIX et L. GEORGES. — *Influence de la variation expérimentale de la tension superficielle sur la vie des Bactéries cultivées en milieu synthétique et en solution peptonée.* (Archiv. f. Mikrobiol., Bd. 3, Heft 5, pp. 561-570, 1932).

- LASSEUR et ses COLLABORATEURS. — *Travaux du Laboratoire de Microbiologie de la Faculté de Pharmacie de Nancy*. Fascicules I (1928), II (1929), III (1930), IV (1931), V (1932).
- LE CHATELIER. — *Science et Industrie*. (Flammarion, Paris, 279 pages, 4^e mille).
- LECOMTE DU NOUY. — *Au sujet d'une note de GOIFFON sur la mesure de la tension superficielle*. (C. R. Soc. Biol., T. XCIV, pp. 266-268, 1926).
- LECOMTE DU NOUY. — *Équilibres superficiels des solutions colloïdales* (Masson et C^{ie}, Paris, 1929).
- R. LEGROUX et J. MAGROU. — *Etat organisé des colonies bactériennes* (Ann. Inst. Pasteur, T. 34, pp. 417-431, 1920).
- W. M. LEWIS. — *Traité de chimie physique*, Tome II. *Thermodynamique*. (Masson et C^{ie}, Paris, p. 268, 1921).
- L. LIPOWSKA, S. SIERAKOWSKI et H. SPARROW. — *Ultrafiltration des toxines scarlatineuses*. (C. R. Soc. Biol., T. 97, p. 954, 1927).
- J. LOEB. — *Les protéines*. (Alcan, Paris, 1924).
- J. LOEB. — *Propriétés colloïdales et cristalloïdales des protéines*. (in Robert-Herman BOGUE, *Traité de Chimie colloïdale*, T. I, p. 21, 1928).
- J. LOMMEL. — *Modifications des propriétés biochimiques du Colibacille sous l'influence de milieux additionnés de matières colorantes*. (C. R. Soc. Biol., T. XCV, pp. 713-715, 1926).
- A.-B. MACALLUM. — *Die Methoden und Ergebnisse der Mikrochemie in der biologischen Forschung*. (Erg. Physiol., Bd. 7, p. 552, 1908).
- G. MANGENOT. — *Action des colorants sur le plasmode de Fuligo septica Gmel.* (C. R. Soc. Biol., T. CX, pp. 907-910, 1932).
- L. MAUME et J. DULAC. — *Définition physico-chimique du minimum de toxicité d'un mélange de deux sels à l'égard des Végétaux*. (C. R. Soc. Biol., T. XCV, p. 23, 1926).
- G. MAZZETTI. — *Ulteriori ricerche circa l'influenza della tensione superficiale sull'azione di alcune sostanze disinfettanti*. (Comm. R. Accademia dei Fisiocritici in Siena nell'Adunanza, 1932).
- P. MENDELEEF, G. HANNEVART et C. PLOTOUTOFF. — *Influence des injections d'HCl sur des altérations nucléaires et sur des changements de la perméabilité cellulaire in vivo*. (C. R. Soc. Biol., T. 94, p. 1272, 1926).
- Arthur MEYER. — *Notiz ueber das Aussehen der Bakterien im Ultramikroskop*. (Archiv f. Protist., T. 24, pp. 76-79, 1912).
- A. MEYER. — *Die Zelle der Bakterien*. (G. FISCHER, Jena, 285 pages, 1912).
- O. MEYERHOF. — *Ueber die Abtrennung des milchsäurebildenden Ferments aus Erythrocyten*. (Biochem. Zeitschr., Bd. 246, Heft 4-6, pp. 249-285, 1932).
- O. MEYERHOF. — *Ueber den Kohlenhydratverbrauch bei der aeroben Tätigkeit des Kaltblütermuskels*. (Biochem. Zeitschr., Bd. 237, Heft 4-6, pp. 427-437, 1932).
- O. MEYERHOF. — *Neuere Versuche zur Energetik der Muskelkontraktion*. (Die Naturwissenschaften, Heft 46, pp. 923-932, 1931).
- O. MEYERHOF et Arthur GROLLMAN. — *Weitere Versuche ueber den Zusammenhang zwischen chemischen Umsatz und osmotischer Druckzunahme im Muskel*. (Biochem. Zeitschr., Bd. 241, Heft 1-3, pp. 23-35, 1931).

- O. MEYERHOF, W. MÖHLE et W. SCHULZ. — *Ueber die Reaktionsänderung des Muskels im Zusammenhang mit Spannungsentwicklung und chemischen Umsatz.* (Biochem. Zeitschr., Bd. 246, Heft 4-6, pp. 285-318, 1932).
- L. MICHAELIS. — *Contribution to the theory of permeability of membranes for electrolytes.* (Journ. gen. Physiol., Vol. 8, p. 33, 1925).
- R. MOND et F. HOFFMANN. — *Untersuchungen an künstlichen Membranen, die elektr. anionenpermeabel sind.* (Pflügers Archiv, Bd. 220, p. 194, 1928).
- A. NETTER, E. ANDRÉ, CESARI et COTONI. — *Action du ricinoléate de sodium sur les Bactéries et les toxines.* (C. R. Soc. Biol., T. LVI, 1927).
- W.-J.-V. OSTERHOUT. — *The permeability of living cells to salts into living protoplasm* (Zeitschr. physik. Chem., Bd. 70, p. 408, 1909).
- W. OSTWALD. — *A handbook of colloïd-chemistry.* (J. et A. Churchill, Londres, 1929).
- E. PANTANELLI. — *Ueber Ionenaufnahme.* (Protoplasma, Bd. VII, pp. 129-137, 1929).
- G. PAPACOSTAS et J. GATE. — *Les associations microbiennes. Leurs applications thérapeutiques.* (Encyclopédie scientifique, G. Doin, Paris).
- M. PETZETAKIS et J. PAPADOPOULO. — *Formes filtrables dans les cultures d'un Champignon isolé d'un cas de Spénomégalie égyptienne et intradermoréaction mycotique.* (C. R. Soc. Biol., T. IXC, p. 274, 1928).
- W. PFEFFER. — *Osmotische Untersuchungen.* (Studien z. Zellmechanik, Leipzig, 1877).
- M. PIETTRE et A. CHRÉTIEN. — *Etude biochimique de l'agglutination. Nouvelles recherches sur les propriétés physiques et chimiques des matières protéiques. Agglutination microbienne. Immunsérums agglutinants et leurs protéines spécifiques.* (Revue de Pathol. comparée et d'Hyg. générale, 1929).
- A. RADOEFF. — *Stimulation de la croissance par des sels minéraux, des colorants vitaux et divers composés organiques chez le Riz.* (C. R. Soc. Biol., T. CX, pp. 955-958, 1932).
- H. RHODE. — *Löslichkeit, Capillaraktivität und hämolytische Wirksamkeit bei Terpenderivatzen.* (Biochem. Zeitschr., Bd. 130, p. 481, 1922).
- W. RUHLAND et C. HOFFMANN. — *Beiträge zur Ultrafiltertheorie des Plasmas.* (Ber. Sächs. Akad. Wiss. Leipzig, Bd. 76, 1924). — *Die Permeabilität von Beggiatoa mirabilis.* (Planta, Berl., Bd. 1, p. 1, 1925).
- G. SANGIORGI. — *Ueber einen eigenartigen, bei einigen Mikrobien durch die Tusche dargestellten Baubefund.* (Centralbl. f. Bakt., I Abt. Orig., Bd. 55, Heft I, pp. 94-96, 1910).
- J.-M. SCHAFFER et F.-W. TILLEY. — *Germicidal efficiency of soaps and of mixtures of soaps with sodium hydroxyde or with phenols.* (Journ. of agricult. research, Vol. 41, n° 10, pp. 737-747, 1930).
- F. SCHAUDINN. — *Beiträge zur Kenntnis der Bakterien und verwandter Organismen.* I. B. Butschlii. (Archiv f. Protist., Bd. 1, pp. 306-343, 1902).
- H. SCHEITTERER. — *Plasmolyse-Ort der Blattpalisaden-Zellen.* (Protoplasma, Bd. X, Heft 2, 1930).
- E. SORU. — *Tension superficielle des suspensions de Vibrions cholériques normaux et sensibilisés.* (C. R. Soc. Biol., T. CIII, n° 6, pp. 635-637, 1930).

- E.-W. STEARN et A.-E. STEARN. — *The chemical mechanism of bacterial behavior. I. Behavior toward dyes-factors controlling the GRAM reaction.* (Journ. of Bact., Vol. 9, pp. 463-477, 1923).
- E.-W. STEARN et A.-E. STEARN. — *The chemical mechanism of bacterial behavior. II. A new theory of the GRAM reaction.* (Journ. of Bact., Vol. 9, pp. 479-489, 1924).
- A.-E. STEARN et E.-W. STEARN. — *The chemical mechanism of bacterial behavior. III. The problem of bacteriostasis.* (Journ. of Bact., Baltimore, Vol. IX, p. 491, 1924).
- J. TRAUBE. — *Osmose, diffusion, tension superficielle et solubilité.* (Journ. de Chimie-physique, T. III, p. 583, 1905).
- J. TRAUBE. — *Die osmotische Kraft.* (Pflügers Archiv, Bd. 123, p. 419, 1908); *Die Theorie des Haftdruckes (Oberflächendruckes).* (Pflügers Archiv, Bd. 140, p. 109, 1911).
- J.-G. VALDECASAS. — *Ueber die Sekretionsarbeit der Leber. III. Mitteilung. Beeinflussung der Farbstoffkonzentrierung durch organische Verbindungen.* (Pflüg. Archiv, Bd. 228, Heft 1 et 2, 1931).
- Franz VAY. — *Studien ueber die Strukturverhältnisse von Bakterien mit Hilfe von farbehaltigen Nährböden.* (Centralbl. f. Bakt., I Abt. Orig., Bd. 55, Heft 3, pp. 193-207, 1910).
- H. VINCENT. — *Nouvelles recherches sur les cryptotoxines. Le phénomène de sursaturation des toxines par l'on salicylique.* (C. R. Acad. Sciences, T. 193, p. 620, 1931).
- H. VINCENT. — *A propos des propriétés cryptotoxiques du salicylate de sodium.* (C. R. Soc. Biol., T. CVIII, p. 756, 1931).
- F. VLÈS. — *Précis de chimie-physique.* (Vigot Frères, Paris, 414 pages, 1929).
- G. WATZADSE. — *Physikalisch-chemische Untersuchungen zur Frage der Stoffverteilung zwischen Zelle und Umgebung.* (Pflüg. Archiv, Bd. 222, Heft 5 et 6, p. 640, 1929).
- F. WEBER. — *Fadenziehen des Endoplasmas bei Spirogyra.* (Protoplasma, Bd. VI, Heft 1, p. 159, 1929).
- F. WEBER. — *Cytoplasma- und Kern-Zustandsänderungen bei Schliesszellen.* (Protoplasma, Bd. II, Heft 2, 1927).
- F. WEBER. — *Plasmolysezeit und Lichtwirkung.* (Protoplasma, Bd. VII, Heft 2, 1929).
- F. WEBER. — *Protoplastische Pflanzenanatomie.* (Protoplasma, Bd. VIII, Heft 2, p. 291, 1929).
- F. WEBER. — *Bildung von Niederschlagsmembranen im Musa-saft mit Neutralrot.* (Protoplasma, Bd. VIII, Heft 3, 1929).
- F. WEBER. — *Plasmolyse in verdünnten Gewebesaft.* (Protoplasma, Bd. VIII, Heft 3, 1929).
- F. WEBER. — *Zentrifugierung und Protoplasma-Viskosität.* (Protoplasma, Bd. VII, Heft 3, p. 444, 1920).
- F. WEBER. — *Plasmolyse Ort.* (Protoplasma, Bd. VII, Heft 4, p. 583, 1929).
- F. WEBER. — *Plasmolyse-Zeit-Methode.* (Protoplasma, Bd. V, Heft 4, p. 622, 1929).
- F. WEBER. — *Vakuolen-Kontraktion Vital gefärbter Elodea-Zellen.* (Protoplasma, Bd. IX, Heft I, p. 106, 1930).

- F. WEBER. — *Vakuolenkontraktion und vitalfärbung in Blütcnzellen* (*Protoplasma*, Bd. XI, Heft 2, p. 312, 1930).
- F. WEBER. — *Harnstoff-Permeabilität ungleich alter Spirogyra-Zellen.* (*Protoplasma*, Bd. XII, Heft 1, p. 129, 1931).
- F. WEBER. — *Plasmolyse-Resistenz und Permeabilität bei Narkose.* (*Protoplasma*, Bd. XIV, Heft 2, p. 179, 1931).
- H.-B. WEISER. — *Gelées et précipités gélatineux.* (in Robert-Herman BOGUE. *Traité de Chimie colloïdale*, T. 1, p. 351, 1928).
- W. WILBRANDT. — *Vergleichende Untersuchungen ueber die Permeabilität pflanzlicher Protoplasten für Anektrolyte.* (*Pflüg. Archiv*, Bd. 229, Heft 1, 1931).
- WURMSER. — *Oxydation et réduction.* (*Presses universitaires*, Paris, 376 pages, 1930).
- ZETTNOW. — *ROMANOWSKI'S Färbung bei Bakterien.* (*Zeitschr. f. Hyg.*, T. 30, pp. 1-19, 1899).
- ZETTNOW. — *Ueber Geisselfärbung bei Bakterien.* (*Zeitschr. f. Hyg.*, T. 30 pp. 95-107, 1899).
- ZETTNOW. — *Kleine Beiträge zur Morphologie der Bakterien.* (*Zeitschr. f. Hyg.*, Bd. 85, pp. 17-32, 1918).
- ZSIGMONDY. — *Chimie colloïdale* (DUNOD, Paris, 539 pages, 1926).

Vu et bon à imprimer :

Nancy, le 13 février 1933.

Le Doyen,

P. SEYOT.

Vu et permis d'imprimer :

Nancy, le 14 février 1933.

Le Recteur de l'Académie,

Président du Conseil de l'Université,

L. BRUNTZ

